

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : Biodiversité, Ecologie, Environnement

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

Cécile MAURICE-BLANC

Thèse dirigée par Dominique FONTVIEILLE

préparée au sein du Centre Alpin de Recherche sur les
Réseaux Trophiques et les Ecosystèmes Limniques
dans l'École Doctorale Sciences et Ingénierie des Systèmes,
de l'Environnement et des Organisations

Distribution des Légionelles dans le bassin versant du lac du Bourget : Cas particulier des sources contaminées du réseau aixois

Thèse soutenue publiquement le 25 Octobre 2011
devant le jury composé de :

Mr Serge RIFFARD

Professeur, Université Jean Monnet S^t Etienne, Rapporteur

Mr Benoît COURNOYER

Directeur de Recherche CNRS, Université Lyon I, Rapporteur

Mme Aurélie TOURON-BODILIS

Ingénieur de Recherche, EDF LNHE Chatou, Membre

Mr Michael STEINERT

Professeur, Technische Universität Braunschweig, Membre

Mr Raffaele PEDUZZI

Professeur, Université de Genève, Membre

Mr Yann HECHARD

Maître de Conférence, ESIP Poitiers, Président

Mr Dominique FONTVIEILLE

Professeur, Université de Savoie, Membre



Remerciements

J'aimerais tout d'abord remercier mon directeur de thèse, M. Dominique FONTVIEILLE, pour la confiance qu'il m'a accordée tout au long de ces années, pour l'autonomie qu'il m'a laissée, mais aussi pour ses conseils avisés, ses créations ingénieuses et son aide sur le terrain lorsque cela a été nécessaire. Sans oublier l'ensemble de ses conseils et de ses encouragements lors de l'interprétation des données, de la rédaction des rapports et bien sûr de ce manuscrit...et pour tout le reste...

Je remercie aussi tout particulièrement Mme Aurélie TOURON-BODILIS, pour ses commentaires toujours pertinents de mes résultats et du contenu de ce mémoire.

Mes remerciements vont bien évidemment à l'Assemblée des Pays de Savoie et plus particulièrement à M. Michel BOUVARD, à EDF, à la SAUR (M. BONNEAU), à la Communauté d'Agglomération du Lac du Bourget et à la ville d'Aix-les-Bains pour l'ensemble du financement qui m'a été accordé afin de réaliser ce travail dans de bonnes conditions.

Je remercie vivement M. Serge RIFFARD, M. Benoit COURNOYER, M. Yann HECHARD pour avoir accepté de juger ce travail. Et bien évidemment M. Michael STEINERT et M. Raffaele PEDUZZI de me faire l'honneur de participer à ce jury.

Je souhaite également remercier M. Philippe MICHAL des Services Techniques d'Aix-les-Bains, pour ses conseils techniques sur les cours d'eau aixois. Et plus particulièrement M. Guillaume YVROUD pour sa disponibilité et son aide très précieuse au cours de l'ensemble des prélèvements effectués à Aix-les-Bains.

Mes remerciements vont également à l'équipe technique des Thermes Chevalley, pour l'accès aux sources et au bassin de rejet, mais aussi pour les informations techniques qu'elle m'a apportée.

Je remercie également à cette occasion l'ensemble des techniciens et ingénieurs du laboratoire CARTEL pour leur aide lors des prélèvements, des dosages et des dénombrements. Et plus particulièrement Mlles Sylvie VIBOUD et Elena FORASACCO qui m'ont supportée (dans tous les sens du terme) au cours de ces années : merci pour vos précieux conseils, votre aide, votre soutien et pour tout ce que vous m'avez appris.

Je souhaite également remercier M. Guillaume PITON (SOGREAH) pour son travail dans la construction du modèle. Et à M. Michel CUNY pour le développement et la mise au point de l'automate et des réacteurs.

Sans oublier Mme Stéphanie GALLINO pour l'ensemble de ses conseils sur le fonctionnement des sources thermales aixoises et son soutien.

Je n'oublie pas l'ensemble des stagiaires qui m'ont aidée ponctuellement sur ce projet et plus particulièrement Aurore qui a su s'investir et se mouiller pour les besoins du modèle, Fanny, Aurélien et Helen pour les expériences en réacteurs.

Je terminerai en remerciant plus particulièrement ma famille et mes amis. Vous m'avez fait confiance, soutenu, encouragé dans les nombreux moments de doutes, redonné le sourire quand c'était nécessaire (et à chaque étalonnage du pHmètre), vous avez su être présents malgré la distance. C'est aussi grâce à vous si j'ai pu arriver jusque-là.

Et à tous ceux que j'ai oubliés je dirai tout simplement MERCI !!!

Sommaire

1	- INTRODUCTION	19
2	- SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	23
2.1	LA BACTERIE <i>LEGIONELLA PNEUMOPHILA</i> (LPN)	25
2.1.1	GENERALITES SUR LA BACTERIE LPN	25
2.1.2	LPN A L'ETAT VIABLE NON CULTIVABLE	35
2.2	LPN DANS L'ENVIRONNEMENT, FACTEURS DE CONTROLE	44
2.2.1	PRESENCE DE LPN DANS L'ENVIRONNEMENT	44
2.2.2	FACTEURS DE CONTROLE	45
2.3	RELATION ENTRE LPN ET LES AUTRES ORGANISMES	46
2.3.1	RELATIONS ENTRE LPN ET LES AUTRES ESPECES BACTERIENNES	46
2.3.2	LPN ET LES PROTISTES	48
2.4	LPN DANS LES BIOFILMS	59
2.4.1	DEFINITION ET STRUCTURE DES BIOFILMS	60
2.4.2	CYCLE DE DEVELOPPEMENT DES BIOFILMS	68
2.4.3	LES AVANTAGES PROCURES PAR LA FORMATION DU BIOFILM	77
2.4.4	INFLUENCE DE L'ENVIRONNEMENT SUR LE DEVELOPPEMENT DES BIOFILMS	79
2.4.5	BIOFILMS ET LEGIONELLES	86
3	- MATERIEL ET METHODES	91
3.1	SITES D'ETUDES	93
3.1.1	STATIONS DE L'ETUDE DU BASSIN VERSANT DU LAC DU BOURGET	93
3.1.2	PRELEVEMENTS SUR LE RESEAU AIXOIS	101
3.1.3	LES SOURCES NATURELLES AIXOISES	104
3.2	DISPOSITIFS D'ECHANTILLONNAGE	106
3.2.1	SUBSTRATS ARTIFICIELS	106
3.2.2	SUBSTRATS NATURELS	108
3.3	REACTEURS BIOLOGIQUES	110
3.3.1	EXPERIENCE SUR L'EFFET DE LA VITESSE DE L'EAU	111
3.3.2	EXPERIENCES SUR L'EFFET DE LA TEMPERATURE DE L'EAU	112
3.4	DESCRIPTEURS SUIVIS	113
3.4.1	DESCRIPTEURS BIOLOGIQUES	114
3.4.2	PARAMETRES PHYSICO-CHIMIQUES	124
3.5	ANALYSES DE DONNEES	129
3.5.1	CALCUL DES MEDIANES ET DISPERSION DES DONNEES	130
3.5.2	TESTS DE COMPARAISON DE DONNEES	130
3.5.3	RECHERCHE DE CORRELATION	130
3.5.4	ANALYSE EN COMPOSANTES PRINCIPALES	131
4	- COMPARAISON DES BIOFILMS EN FONCTION DE LA TECHNIQUE D'ECHANTILLONNAGE	133
4.1	COMPARAISON DES CARACTERISTIQUES GENERALES DES BIOFILMS	135
4.1.1	POIDS SEC DU BIOFILM	135

4.1.2	CONCENTRATION EN MATIERE ORGANIQUE	138
4.1.3	PROPORTION DE MATIERE ORGANIQUE	140
4.2	COMMUNAUTE BACTERIENNE	143
4.2.1	CONCENTRATION DES BACTERIES _{TOTALES}	143
4.2.2	CONCENTRATIONS DES BACTERIES _{CULTIVABLES}	146
4.2.3	PROPORTION DES BACTERIES _{CULTIVABLES}	148
4.3	LPN ET SES DIFFERENTS ETATS PHYSIOLOGIQUES	151
4.3.1	CONCENTRATIONS DE <i>LPN</i> _{TOTALES}	151
4.3.2	PROPORTIONS DE <i>LPN</i> _{TOTALES}	154
4.3.3	CONCENTRATIONS DE <i>LPN</i> _{FISH}	157
4.3.4	PROPORTIONS DE <i>LPN</i> _{FISH}	159
4.3.5	RAPPORT ENTRE <i>LPN</i> _{TOTALES} ET <i>LPN</i> _{FISH}	162
4.3.6	CONCENTRATION DE <i>LPN</i> _{CULTIVABLES}	165
4.4	COMPARAISON DE LA COLONISATION DES BIOFILMS PAR LES PROTISTES	166
4.4.1	CONCENTRATIONS DES AMIBES	166
4.4.2	CONCENTRATIONS DES CILIES	169
4.4.3	CONCENTRATIONS DES FLAGELLES	169
4.5	INFLUENCE DE LA TECHNIQUE D'ECHANTILLONNAGE DES BIOFILMS	173
4.6	CONCLUSIONS CONCERNANT L'IMPORTANCE DE LA TECHNIQUE D'ECHANTILLONNAGE DES BIOFILMS	174

5 - DISTRIBUTION DE L. PNEUMOPHILA DANS LES BIOFILMS DES AFFLUENTS DU LAC DU BOURGET : ANALYSE DES FACTEURS DE CONTROLE POTENTIELS 177

5.1	VARIATIONS DES DEBITS DES COURS D'EAU DURANT LA PHASE DE DEVELOPPEMENT DES BIOFILMS	179
5.2	CARACTERISTIQUES DES CAMPAGNES DE PRELEVEMENT DU POINT DE VUE DES EVENEMENTS HYDROLOGIQUES ..	180
5.2.1	AOUT 2007	181
5.2.2	OCTOBRE 2007	183
5.2.3	JANVIER 2008	185
5.2.4	MARS 2008	188
5.2.5	MAI 2008	190
5.2.6	JUILLET 2008	192
5.2.7	OCTOBRE 2008	195
5.2.8	JANVIER 2009	197
5.2.9	MAI 2009	200
5.3	INFLUENCE DES EVENEMENTS HYDROLOGIQUES SUR LE DEVELOPPEMENT DES BIOFILMS	204
5.3.1	ETUDE DES VARIATIONS DE DEBITS	204
5.3.2	CONCLUSIONS SUR LES VARIATIONS HYDRODYNAMIQUES ET LEURS CONSEQUENCES	216
5.4	OCCURRENCE DE <i>LEGIONELLA PNEUMOPHILA</i> (<i>LPN</i>) DANS LES BIOFILMS	216
5.4.1	CONCENTRATIONS DE <i>LPN</i> _{TOTALES}	217
5.4.2	CONCENTRATIONS EN " <i>LPN</i> _{FISH} "	223
5.4.3	CONCENTRATIONS DE <i>LPN</i> _{CULTIVABLES}	228
5.5	RECHERCHE DE CORRELATIONS ENTRE LES CONCENTRATIONS EN <i>LPN</i> ET LES AUTRES DESCRIPTEURS DU BIOFILM ..	229
5.6	RECHERCHE DE CORRELATIONS ENTRE LES CONCENTRATIONS EN <i>LPN</i> ET LES DESCRIPTEURS PHYSICO-CHIMIQUES ..	231
5.7	CONCLUSIONS SUR LA PRESENCE DE <i>LPN</i> DANS LES BIOFILMS DES AFFLUENTS DU LAC DU BOURGET	238

6 - EVOLUTION DES BIOFILMS LE LONG D'UN COURS D'EAU, LA CHAUDANNE, A L'AVANT DES CHARGES APPORTEES PAR DES SOURCES CHAUDES SULFUREUSES ET UN ETABLISSEMENT THERMAL : HYPOTHESE DE L'EXISTENCE D'UN PROCESSUS D'AUTOEPURATION 239

6.1	EVOLUTION DES DESCRIPTEURS PHYSIQUES ET CHIMIQUES LE LONG DU RESEAU HYDROGRAPHIQUE AIXOIS : MODIFICATIONS DUES AUX APPORTS DES EAUX THERMALES	242
6.1.1	DEBIT.....	242
6.1.2	TEMPERATURE	247
6.1.3	AUTRES CARACTERISTIQUES PHYSIQUES ET CHIMIQUES DE L'EAU	254
6.1.4	INFLUENCE DES APPORTS THERMAUX SUR LE DEVELOPPEMENT DES BIOFILMS – MISE EN EVIDENCE DES CONSEQUENCES DES PROCESSUS D'AUTO-EPURATION SUR LPN	260
6.2	RECHERCHE DES PRINCIPAUX FACTEURS DE REGULATION DE LPN DANS LES BIOFILMS DU RESEAU AIXOIS.....	281
6.2.1	ANALYSE DE LA STRUCTURE GENERALE DES DONNEES ET MISE EN EVIDENCE DE TERMES DE REGROUPEMENTS EXPLICITES.	282
6.2.2	RECHERCHE DES PRINCIPAUX FACTEURS DE REGULATION DE LPN SUR LA BASE DES GROUPES D'ECHANTILLONS PRECEDEMMENT CONSTITUES.....	292
6.3	CONCLUSIONS DE L'ETUDE DU RESEAU HYDROGRAPHIQUE AIXOIS	333
7	<u>- EFFETS PARTICULIERS DE LA VITESSE DE L'EAU.....</u>	335
7.1	EVOLUTION DE LA CONCENTRATION DES BACTERIES_{TOTALES}.....	338
7.2	EVOLUTION DE LA COMMUNAUTE BACTERIENNE CULTIVABLE DU BIOFILM	341
7.2.1	CONCENTRATION DES BACTERIES _{CULTIVABLES}	341
7.2.2	PROPORTION DES FORMES CULTIVABLES DANS LA COMMUNAUTE BACTERIENNE DU BIOFILM	344
7.3	EVOLUTION DES DIFFERENTES FORMES DE LPN AU SEIN DES BIOFILMS EN FONCTION DE LA VITESSE DE ROTATION	347
7.3.1	CONCENTRATIONS EN LPN _{TOTALES}	347
7.3.2	PROPORTIONS DE LPN _{TOTALES}	350
7.3.3	CONCENTRATIONS DE LPN _{CULTIVABLES}	352
7.3.4	PROPORTIONS DE LPN _{CULTIVABLES}	355
7.4	CAS DES FLAGELLES.....	357
7.4.1	SUIVI DE LA CONCENTRATION DES FLAGELLES	357
7.5	EFFET DE LA VITESSE SUR LES CORRELATIONS ENTRE DESCRIPTEURS BACTERIENS	359
7.5.1	RELATIONS ENTRE LES CONCENTRATIONS EN BACTERIES _{TOTALES} ET EN BACTERIES _{CULTIVABLES}	359
7.5.2	RELATIONS ENTRE LES CONCENTRATIONS DE LPN _{TOTALES} ET DE BACTERIES _{TOTALES}	360
7.5.3	RELATIONS ENTRE LES CONCENTRATIONS DE LPN _{CULTIVABLES} ET LES CONCENTRATIONS DES BACTERIES _{TOTALES}	361
7.5.4	RELATIONS ENTRE LES CONCENTRATIONS DE LPN _{TOTALES} ET CELLES DES BACTERIES _{CULTIVABLES}	362
7.5.5	ANALYSE DES CORRELATIONS POTENTIELLES ENTRE LES CONCENTRATIONS DE LPN _{CULTIVABLES} ET DE BACTERIES _{CULTIVABLES}	363
7.5.6	RELATIONS ENTRE PROPORTION DE LPN _{CULTIVABLES} ET LA CONCENTRATION DES BACTERIES _{TOTALES}	364
7.5.7	RECHERCHE DE CORRELATIONS IMPLIQUANT LES CONCENTRATIONS DES FLAGELLES	365
7.6	CONCLUSIONS CONCERNANT L'EFFET DE LA VITESSE SUR LA COMPOSITION DES BIOFILMS	369
8	<u>EFFET DES CHANGEMENTS DE LA TEMPERATURE DE L'EAU SUR LA PRESENCE DE L. PNEUMOPHILA DANS UN BIOFILM : ETUDE EXPERIMENTALE.</u>	373
8.1	EVOLUTION DE LA COLONISATION DES BIOFILMS A TRAVERS LA CONCENTRATION EN BACTERIES_{TOTALES}.....	377
8.2	CONCENTRATIONS ET PROPORTIONS DES BACTERIES_{CULTIVABLES}	381
8.2.1	CONCENTRATIONS DES BACTERIES _{CULTIVABLES}	381
8.2.2	PROPORTIONS DE BACTERIES _{CULTIVABLES}	383
8.3	CONCENTRATIONS ET PROPORTIONS DE LPN_{TOTALES}.....	385
8.3.1	CONCENTRATION DE LPN _{TOTALES}	385
8.3.2	PROPORTIONS DE LPN _{TOTALES}	386
8.4	CONCENTRATIONS ET PROPORTIONS DE LPN_{CULTIVABLES} (GVPC).....	388
8.4.1	CONCENTRATIONS DE LPN _{CULTIVABLES}	388

8.4.2	PROPORTIONS DE $LPN_{CULTIVABLES}$	391
8.5	CONCENTRATIONS DE PROTISTES	392
8.5.1	CONCENTRATIONS DES CILIES	394
8.5.2	CONCENTRATIONS D'AMIBES	395
8.5.3	CONCENTRATIONS DES FLAGELLES	397
8.5.4	IMPORTANCES RELATIVES DES DIFFERENTS GROUPES DE PROTISTES	399
8.6	RECHERCHE DE CORRELATIONS ENTRE LES DESCRIPTEURS.....	401
8.7	CONCLUSIONS SUR L'EFFET DE LA TEMPERATURE	406
9	<u>- MODELISATION DU TRANSPORT DE LPN VERS LE LAC EN FONCTION DES CONDITIONS METEOROLOGIQUES</u>	<u>407</u>
9.1	REALISATION DU MODELE PLUIE-DEBIT	409
9.1.1	ENREGISTREMENT DES DEBITS	411
9.1.2	CHOIX DES EVENEMENTS ORAGEUX	411
9.1.3	CALAGE DU MODELE PLUIE-DEBIT	412
9.1.4	VALIDATION DU CALAGE DU MODELE.....	413
9.1.5	NOUVELLE VALIDATION DU MODELE SUR LA BASE DES PLUIES DE LA STATION METEO DE VOGLANS	414
9.2	COUPLAGE ENTRE LE MODELE PLUIE-DEBIT ET LES DONNEES SUR LE TRANSPORT DE CHARGE	416
9.2.1	DETERMINATION DU DEBIT CRITIQUE PAR L'ETUDE DE LA CHARGE DE LA COLONNE D'EAU	416
9.2.2	DETERMINATION DU DEBIT CRITIQUE PAR L'ETUDE DES BIOFILMS A LA STATION AQUARIUM.....	418
9.2.3	CONCLUSION.....	420
10	<u>CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....</u>	<u>423</u>
11	<u>BIBLIOGRAPHIE.....</u>	<u>435</u>
12	<u>ANNEXES</u>	<u>453</u>

Figure 1: Modèle de régulation des traits de virulence (à gauche) et plus particulièrement du système lqs (à droite) (Tiaden, et al., 2010).....	34
Figure 2 : Sites cellulaires pouvant être ciblés par les sondes fluorescentes physiologiques ou taxonomiques (Joux & Lebaron, 2000)	40
Figure 3: Modèle d'un système de sécrétion de type II (la protéine O correspond chez Lpn à la protéine PilD) (Cianciotto, 2009).....	51
Figure 4 : Cycle de développement intra-cellulaire de Lpn dans les protistes (Faulkner & Garduno, 2002)	54
Figure 5: cycle de développement de Lpn dans l'environnement (Molofsky & Swanson, 2004) (étapes 1 à 4 : réplication intra-cellulaire dans les protistes, Lpn prend tout d'abord une forme réplicative avant puis sa Forme Intra-cellulaire Mature ; 5 : libération de Lpn dans l'environnement ; 6 : en absence de nouvel hôte Lpn colonise un biofilm ; 7 : Retour de Lpn à l'état planctonique suivie d'une phagocytose par un nouvel hôte ; 8 : alternance entre la forme réplicative et la forme transmissible en milieu de culture).....	60
Figure 6: Représentation schématique de l'architecture d'un biofilm avec la présence d'amas cellulaires (cell cluster), des portions effilées de la masse qui rejoignent l'eau libre circulante et à partir desquelles se produisent des décrochages et un essaimage de cellules (streamers), mais aussi d'espaces ne contenant pas de bactéries (void). Les canaux (channel) permettent une circulation d'eau et de nutriments à travers la base du biofilm notamment (P. Dirckx, 1997).	65
Figure 7 : Développement du biofilm dans le temps	69
Figure 8: Rôle du flagelle et des pili de type IV lors de la formation des biofilms à <i>P. aeruginosa</i> (O'Toole & Kolter, 1998).....	72
Figure 9 : Détermination du morphotype du biofilm en fonction de la vitesse de l'eau et de la concentration en nutriments (Stoodley, et al., 1999).....	83
Figure 10: Représentation de la structure et de l'activité du biofilm en fonction de la disponibilité en glucose et en lumière (Ylla, et al., 2009)	85
Figure 11: Bassin versant du lac du Bourget et sous bassins correspondants à ses affluents. Localisation des stations (1: Sierroz ; 2 : Aquarium ; 3 : Tillet ; 4 : Terre Nue ; 5 : Hyères ; 6 : Albanne; 7 : Laysse ; 8 : Plage ; 9 : Savières)	95
Figure 12: Mesures instantanées de la vitesse de l'eau au point d'incubation des biofilms	98
Figure 13: Mesures de l'intensité lumineuse en surface et aux points d'incubation des biofilms pour chacune des stations du bassin versant.....	98
Figure 14: Plan du réseau hydrographique de la ville d'Aix-les-Bains et emplacement des 5 stations échantillonnées au cours du volet II (les étoiles représentent les arrivées d'eaux thermales).....	102
Figure 15: Schéma de circulation des eaux thermales d'Aix-les-Bains (Gallino, 2006)	105
Figure 16: Schéma de circulation entre le siphon Terminator et les sources Soufre et Alun (Gallino, 2006)	105
Figure 17: dispositif d'échantillonnage de biofilm par la technique des substrats artificiels.....	107
Figure 18: Améliorations apportées au dispositif d'échantillonnage pour les stations Aquarium (à gauche) et Liège (à droite).	107
Figure 19: Dispositif d'échantillonnage des substrats naturels (à droite: visualisation du biofilm par différence avec la zone échantillonnée). Les flèches représentent le sens de circulation de l'eau entre le pilulier et la zone du substrat échantillonnée.....	109
Figure 20: Dispositif de prélèvements des substrats naturels utilisé lors de la campagne de mai 2008 et mis en œuvre également à la station Aquarium	110
Figure 21: Banc de réacteurs composé de 3 incubateurs (chacun d'entre eux représentant un réplikat).....	111
Figure 22: Carrousel supportant 10 substrats artificiels	111
Figure 23: GeneExtract équipé des cylindres de filtration.....	121
Figure 24: GeneDisc vue de dessus (à gauche) et GeneDisc cycler (à droite).....	122
Figure 25: Stations du réseau hydrographique aixois équipées en limnigraphes.	127
Figure 26 : Courbes de tarages des stations du réseau aixois équipées d'un limnigraphe	129
Figure 27: Comparaison du poids sec des biofilms en fonction du type de substrat.....	136
Figure 28: Comparaison du poids sec des biofilms par station en fonction du type de substrat	137
Figure 29: comparaison de la concentration en matière organique en fonction du type de substrat	139
Figure 30: Comparaison des concentrations en matière organique des biofilms selon le type de substrat	140
Figure 31: Comparaison de la proportion de la matière organique (Matière organique / Poids sec) du biofilm.....	141
Figure 32: Comparaison des rapports Matière organique/Poids Sec par campagne en fonction du type de substrat	143

Figure 33: Comparaison de la concentration en bactéries _{totales} (DAPI).....	144
Figure 34: Comparaison des concentrations en bactéries _{totales} par stations en fonction du type de substrat.....	146
Figure 35: Comparaison des concentrations de bactéries _{cultivables}	147
Figure 36: Comparaison des concentrations en bactéries _{cultivables} en fonction du type de substrat.....	148
Figure 37 : Comparaison de la proportion de bactéries _{cultivables} (Bactéries _{cultivables} /Bactéries _{totales}) en fonction du type de substrat	150
Figure 38: Comparaison de la proportion de bactéries _{cultivables} par type de substrats	151
Figure 39: Comparaison de la concentration de Lpn _{totales} (immuno) en fonction du type de substrat	153
Figure 40 : Comparaison de la concentration en Lpn _{totales} (immuno) par type de substrat.....	154
Figure 41: Comparaison de la proportion de Lpn _{totales} au sein de la communauté bactérienne (Lpn _{totales} /Bactéries _{totales})	156
Figure 42 : Comparaison de la proportion de Lpn _{totales} (Lpn _{totales} /Bactéries _{totales}) par type de substrat.....	157
Figure 43: Comparaison de la concentration de Lpn _{FISH} en fonction du type de substrat	158
Figure 44 : Comparaison de la concentration en Lpn _{FISH} par type de substrat	159
Figure 45: Comparaison de la proportion de Lpn _{FISH} (Lpn _{FISH} /Bactéries _{totales}) en fonction du type de substrat	161
Figure 46 : Comparaison de la proportion de Lpn _{FISH} (Lpn _{FISH} /Bactéries _{totales}) pour chaque type de substrat	162
Figure 47: Comparaison du rapport Lpn _{FISH} / Lpn _{totales} en fonction du type de substrat.....	163
Figure 48 : Comparaison du rapport Lpn _{FISH} / Lpn _{totales} par type de substrat	164
Figure 49 : Comparaison de la concentration en amibes en fonction du type de substrat	167
Figure 50 : Comparaison de la concentration des amibes par type de substrat	169
Figure 51: Comparaison de la concentration en flagellés en fonction du type de substrat	171
Figure 52 : Comparaison de la concentration en flagellés par type de substrat.....	172
Figure 53: Débit médian pour la période complète (bleu), pour la période de pré-incubation (rouge) et pour la période d'incubation (vert).....	182
Figure 54: Suivi des débits lors de la campagne d'août 2007.....	183
Figure 55 : débit médian pour la période complète (bleu), pour la période de pré-incubation (rouge), pour la période d'incubation (vert).....	184
Figure 56: suivi des débits lors de la campagne d'octobre 2007.....	185
Figure 57 : débit médian pour la période complète (bleu), pour la période de pré-incubation (rouge), pour la période d'incubation (vert).....	186
Figure 58 : suivi des débits lors de la campagne de janvier 2008	187
Figure 59 : débit médian pour la période complète (bleu), pour la période de pré-incubation (rouge), pour la période d'incubation (vert).....	188
Figure 60 : suivi des débits lors de la campagne de mars 2008	189
Figure 61: suivi des débits lors de la campagne de mai 2008	191
Figure 62 : débit médian pour la période complète (bleu), pour la période de pré-incubation (rouge), pour la période d'incubation (vert).....	192
Figure 63 : débit médian pour la période complète (bleu), pour la période de pré-incubation (rouge), pour la période d'incubation (vert).....	193
Figure 64 : suivi des débits lors de la campagne de juillet 2008.....	194
Figure 65 : débit médian pour la période complète (bleu), pour la période de pré-incubation (rouge), pour la période d'incubation (vert).....	195
Figure 66: suivi des débits lors de la campagne d'octobre 2008.....	196
Figure 67 : débit médian pour la période complète (bleu), pour la période de pré-incubation (rouge), pour la période d'incubation (vert).....	198
Figure 68 : suivi des débits lors de la campagne de janvier 2009	199
Figure 69: débit médian pour la période complète (bleu), pour la période de pré-incubation (rouge), pour la période d'incubation (vert).....	201
Figure 70: suivi des débits lors de la campagne de mai 2009	202
Figure 71: Poids sec des biofilms par station et par campagne. Les flèches noires représentent un $\Delta Q > 100\%$ survenu lors de la première semaine de l'incubation, les flèches rouges, un $\Delta Q > 100\%$ survenu lors de la deuxième semaine de l'incubation	206
Figure 72: Evolution des concentrations en Lpn _{totales} (immuno) par station et par campagne	218
Figure 73: Proportion de Lpn _{totales} dans la communauté bactérienne totale des biofilms	221
Figure 74: Evolution de la concentration de Lpn dénombrées par la méthode du FISH.....	224
Figure 75: Proportion des Lpn _{totales} marquées par la méthode FISH (Lpn _{FISH} /Lpn _{totales}).....	226

Figure 76: Concentrations en $L_{pn_{\text{totales}}}$ en fonction de la concentration en bactéries $_{\text{cultivables}}$ pour les biofilms de la station Aquarium (n=9) et du groupe de stations Leyse, Hyères et Albanne (n=27).	230
Figure 77: Concentrations en L_{pn} totales ou cultivables en fonction de la température de l'eau pour différents groupes de stations (n=9 à 18).	233
Figure 78: Représentation des principales corrélations existantes entre les L_{pn} et les descripteurs physico-chimiques pour chaque groupe de stations (n=9 à 27).	235
Figure 79: Corrélations entre les L_{pn} et les espèces ioniques restreintes à des stations considérées individuellement (n=8 à 9).	236
Figure 80: Aspects des biofilms échantillonnés le long du réseau aixois au cours de la campagne de juin 2009.	242
Figure 81: Suivi des débits moyens journaliers le long du réseau au cours de la campagne de décembre 2007.	243
Figure 82: Suivi des débits moyens journaliers le long du réseau au cours de la campagne de juin 2008.	244
Figure 83: Suivi des débits moyens journaliers le long du réseau au cours de la campagne de septembre 2008.	244
Figure 84: Suivi des débits moyens journaliers le long du réseau au cours de la campagne de décembre 2008.	245
Figure 85: Suivi des débits moyens journaliers le long du réseau au cours de la campagne de mars 2009.	246
Figure 86: Suivi des débits moyens journaliers le long du réseau au cours de la campagne de juin 2009.	246
Figure 87: Evolution de la température sur la partie haute du réseau dans la période du 26 novembre au 3 décembre 2007.	248
Figure 88: Suivi de la température moyenne journalière le long du réseau au cours de la campagne de décembre 2007.	249
Figure 89: Suivi de la température moyenne journalière le long du réseau au cours de la campagne de juin 2008.	249
Figure 90 : Suivi de la température moyenne journalière le long du réseau au cours de la campagne de septembre 2008.	250
Figure 91: Suivi de la température moyenne journalière le long du réseau au cours de la campagne de décembre 2008.	250
Figure 92: Suivi de la température moyenne journalière le long du réseau au cours de la campagne de mars 2009.	251
Figure 93: Suivi de la température moyenne journalière le long du réseau au cours de la campagne de juin 2009.	251
Figure 94: Comparaison des stations sur la base des écarts de leur température vis-à-vis de celle de la station Mirabeau, prise pour référence.	253
Figure 95: Comparaison des stations sur la base des écarts de leur pH vis-à-vis de celui de la station Mirabeau, prise pour référence.	255
Figure 96: Comparaison des stations sur la base des écarts de la concentration en COD vis-à-vis de la concentration au niveau de la station Mirabeau, prise pour référence.	256
Figure 97: Comparaison des stations sur la base des écarts des concentrations ioniques par rapport à celles de la station Mirabeau, prise pour référence.	258
Figure 98: Comparaison des stations sur la base des écarts de conductivité par rapport à celle de la station Mirabeau, prise pour référence.	259
Figure 99: Comparaison des stations sur la base des écarts du poids sec de biofilm par rapport à la valeur de la station Mirabeau, prise pour référence.	261
Figure 100: Comparaison des stations sur la base des écarts de la concentration des biofilms en matières organiques par rapport à la valeur de la station Mirabeau, prise pour référence.	262
Figure 101: Comparaison des stations sur la base des écarts de la proportion des matières organiques vis-à-vis des valeurs de la station Mirabeau, prise pour référence.	263
Figure 102: Comparaison des stations sur la base des écarts de la concentration en bactéries $_{\text{totales}}$ vis-à-vis des valeurs de la station Mirabeau, prise pour référence.	264
Figure 103: Comparaison des stations sur la base des écarts de la concentration en bactéries $_{\text{cultivables}}$ vis-à-vis des valeurs de la station Mirabeau, prise pour référence.	266
Figure 104: Comparaison des stations sur la base des écarts du pourcentage de bactéries $_{\text{cultivables}}$ ($\text{bactéries}_{\text{cultivables}}/\text{bactéries}_{\text{totales}}$) vis-à-vis des valeurs de la station Mirabeau, prise pour référence.	267
Figure 105: Comparaison des stations sur la base des écarts de la concentration de L_{pn} vis-à-vis des valeurs de la station Mirabeau, prise pour référence.	268
Figure 106: Comparaison des stations sur la base des écarts des proportions de L_{pn} vis-à-vis des valeurs de la station Mirabeau, prise pour référence.	270
Figure 107: Comparaison des stations sur la base des écarts des concentrations de $L_{pn_{\text{cultivables}}}$ vis-à-vis des valeurs de la station Mirabeau, prise pour référence.	271

Figure 108: Comparaison des stations sur la base des écarts des concentrations des bactéries du groupe "Pseudomonas et bactéries apparentées" par référence aux valeurs de la station Mirabeau	273
Figure 109: Comparaison des stations sur la base des écarts des proportions des bactéries du groupe "Pseudomonas et bactéries apparentées" vis-à-vis des valeurs de la station Mirabeau, prise pour référence	275
Figure 110: Comparaison des stations sur la base des écarts des concentrations de "Pseudomonas _{cultivables} et des bactéries apparentées" vis-à-vis des valeurs de la station Mirabeau, prise pour référence	276
Figure 111: Comparaison des stations sur la base des écarts des proportions de bactéries du groupe "Pseudomonas _{cultivables} et bactéries apparentées" vis-à-vis des valeurs de la station Mirabeau, prise pour référence	278
Figure 112: Evolution des concentrations et des proportions de Lpn _{cultivables} (Lpn _{cultivables} /Lpn _{totales}) en fonction des concentrations et des proportions des bactéries du groupe "Pseudomonas _{cultivables} et bactéries apparentées" ("Pseudomonas _{cultivables} et bactéries apparentées"/"Pseudomonas _{FISH} et bactéries apparentées"). (Campagne de Juin 2009, toutes stations confondues ; n=5).	279
Figure 113: Evolution des concentrations et des proportions de Lpn _{cultivables} (Lpn _{cultivables} /Lpn _{totales}) en fonction de la concentration et des proportions des bactéries du groupe "Pseudomonas _{cultivables} et bactéries apparentées" ("Pseudomonas _{cultivables} et bactéries apparentées"/"Pseudomonas _{FISH} et bactéries apparentées"). (Station Liège, toutes campagnes confondues ; n=5).	279
Figure 114: Concentrations en Lpn _{totales} en fonction des concentrations en "Pseudomonas _{FISH} et bactéries apparentées" selon la campagne. (n=4 à 5).....	280
Figure 115: Concentrations en Lpn _{totales} en fonction des concentrations en "Pseudomonas _{FISH} et bactéries apparentées" selon la station (n=5 à 6).....	281
Figure 116: Cercle factoriel des descripteurs dans le plan formé par les deux premiers axes	282
Figure 117: Projection des prélèvements dans le plan factoriel constitué des 2 premiers axes.....	284
Figure 118: Cercle factoriel des descripteurs dans le plan formé par les axes 1 et 3	285
Figure 119: Projection des prélèvements dans le plan factoriel constitué des axes 1 et 3.....	286
Figure 120: Cercle factoriel des descripteurs dans le plan formé par les axes 1 et 2	288
Figure 121: Projection des prélèvements dans le plan factoriel constitué des 2 premiers axes.....	289
Figure 122: Cercle factoriel des descripteurs dans le plan formé par les axes 1 et 3	290
Figure 123: Projection des prélèvements dans le plan factoriel constitué des 2 premiers axes.....	291
Figure 124: Influence de la température sur les concentrations de "Pseudomonas _{FISH} et bactéries apparentées" à la station Mirabeau (n=6).	293
Figure 125: Effet du pH sur les rapports Lpn _{totales} /Bactéries _{totales} (DAPI) et Lpn _{totales} /Amibes à la station Mirabeau (n=6).	294
Figure 126: Effet de la concentration en COD de l'eau sur le développement de la fraction organique du biofilm, sur les concentrations des bactéries du groupe "Pseudomonas _{FISH} et bactéries apparentées", ainsi que sur la concentration en potassium de l'eau (n=6).....	295
Figure 127: Influence des ions potassium sur le rapport Lpn _{totales} / amibes (n=6).....	296
Figure 128: Evolution des concentrations en chlorures et en sodium de l'eau (n=6).....	296
Figure 129: Influence des ions phosphates sur les concentrations des bactéries _{totales} , des bactéries _{cultivables} et des Lpn _{totales} dans les biofilms de la station Mirabeau ainsi que sur l'importance de leur fraction organique (n=6).	297
Figure 130: Evolution des bactéries _{cultivables} et des Lpn _{totales} en fonction de la concentration en bactéries _{totales} (n=6).	298
Figure 131: Influence du débit médian de la période de pré-incubation sur les rapports bactéries _{totales} / amibes et Lpn _{totales} / amibes (n=6).....	299
Figure 132: Influence du débit médian de la période d'incubation sur la concentration en potassium de l'eau à la station Parking (n=6).....	300
Figure 133: Influence de la concentration en potassium de l'eau sur les concentrations d'amibes et sur la proportion des formes cultivables de "Pseudomonas et des bactéries apparentées" à la station Parking (n=6).....	300
Figure 134: Influence du débit médian (pré-incubation + incubation) sur la concentration en matière organique ainsi que sur les rapports bactéries _{totales} /amibes et Lpn _{totales} /amibes (n=6).....	301
Figure 135: Influence du pH sur le développement des biofilms à la station Parking (bactéries _{totales} , concentration et proportion des bactéries du groupe "Pseudomonas _{FISH} et bactéries apparentées", proportions flagellés – bactéries ; n=6).....	302
Figure 136: Importance des ions chlorures dans la mesure de la conductivité et relation entre la conductivité et l'importance de la fraction organique des biofilms (n=6).	303

Figure 137: Influence des espèces ioniques, sulfates, sodium, calcium et du poids sec sur le développement des biofilms (n=6).	304
Figure 138: Influence du COD de l'eau sur les proportions de flagellés par rapport aux bactéries _{cultivables} (n=6).	305
Figure 139: Relation entre la concentration en matière organique du biofilm et la concentration de bactéries _{cultivables} et de Lpn _{totales} (n=6).	305
Figure 140: Relation entre les concentrations de Lpn _{totales} et des bactéries _{cultivables} (n=6).	306
Figure 141: Influence des débits médians des périodes de pré-incubation et d'incubation sur la quantité de chaleur vue par le biofilm (n=7).	308
Figure 142: influence du débit médian de la période d'incubation sur la conductivité, le pH, les bactéries du groupe "Pseudomonas _{cultivables} et bactéries apparentées" et Lpn _{totales} (n=6).	309
Figure 143: Influence du débit de la période précédent l'incubation sur les proportions en Lpn des bactéries du biofilm (n=6).	310
Figure 144: A: Relation entre d'une part, la température médiane et d'autre part, le pH et la concentration de "Pseudomonas _{cultivables} et de bactéries apparentées". B : Relation entre le débit médian durant la période d'incubation et la température médiane (n=7).	311
Figure 145: Relation entre la quantité de chaleur apportée par la rivière au cours de l'incubation (degrés jour) d'une part et d'autre part, le pH, les concentrations des ions chlorures et sodium, la conductivité de l'eau et la concentration des bactéries du groupe "Pseudomonas _{cultivables} et bactéries apparentées" du biofilm (n=7).	312
Figure 146: Relation entre le pH et les concentrations de sulfates et de magnésium (n=9).	313
Figure 147: Impact de la température sur la concentration en COD de l'eau et relation entre la concentration en COD et la concentration en phosphates ainsi qu'entre le COD et la proportion de bactéries du groupe "Pseudomonas _{FISH} et bactéries apparentées" du biofilm. (n=6 à 8).	313
Figure 148: Relation entre les concentrations des principales espèces ioniques et les descripteurs du biofilm (n=8).	315
Figure 149: Relation entre les concentrations des différents états physiologiques de Lpn et la concentration de "Pseudomonas _{FISH} et des bactéries apparentées" (n=8).	316
Figure 150: Relation entre la concentration de matière organique du biofilm et les concentrations de bactéries _{cultivables} de Lpn _{cultivables} et des bactéries du groupe "Pseudomonas _{cultivables} et bactéries apparentées" (n=8).	317
Figure 151: Relation entre les concentrations de Lpn _{cultivables} et les concentrations de protistes et plus particulièrement des amibes (n=8).	318
Figure 152: Relation entre le débit médian de la période d'incubation et la concentration des ions phosphates (n=7).	319
Figure 153: Influence du débit de la période de pré-incubation sur les concentrations de bactéries _{totales} (n=7).	319
Figure 154: Relation entre la température et la présence de Lpn sous ses différents états physiologiques et entre la température et la concentration de matière organique du biofilm (n=7).	320
Figure 155: A: Relation entre la température, d'une part et d'autre part, la concentration des protistes, des amibes et du rapport bactéries _{totales} / amibes. B: Relation entre la concentration des amibes et celle des matières organiques du biofilm (n=7).	321
Figure 156: Relation entre la température et les concentrations des ions sulfates et sodium (n=7).	322
Figure 157: Relation entre la concentration de COD et les concentrations bactériennes (n=9).	323
Figure 158: Relation entre la conductivité, d'une part et, d'autre part, le développement de Lpn _{cultivables} des bactéries du groupe "Pseudomonas et bactéries apparentées" ainsi que de la proportion de ces deux groupes bactériens (n=9).	324
Figure 159: Relation entre plusieurs descripteurs du développement bactérien du biofilm et les concentrations des ions phosphates et potassium (n=9).	325
Figure 160: Relation entre les concentrations des ions nitrates et celles des protistes (n=9).	326
Figure 161: Relations entre la concentration des ions calcium et les rapports Lpn _{totales} /amibes et "Pseudomonas _{cultivables} et bactéries apparentées"/bactéries _{cultivables} (n=9).	326
Figure 162: Relations entre la concentration en sulfates, d'une part et d'autre part, la température médiane (de la période d'incubation) et la proportion de bactéries du groupe "Pseudomonas _{cultivables} et bactéries apparentées" (par rapport aux bactéries _{cultivables} ; n=8 à 9).	327
Figure 163: Relation entre les concentrations de l'ion magnésium et les différents descripteurs de Lpn (n=9).	328
Figure 164: Influence des ions chlorures sur le développement du biofilm (n=9).	329
Figure 165: Relations entre la concentration des ions sodium et le développement des biofilms, notamment avec la concentration de Lpn sous ses différents états physiologiques (n=9).	330

Figure 166: Corrélations entre les descripteurs biologiques des biofilms (n=9).	332
Figure 167: Nombre d'observations appartenant à chaque gamme de vitesse au niveau de la station Parking lors des mesures effectuées dans le cadre des jaugages pour l'étalonnage des limnigraphes	337
Figure 168: Evolution de la concentration bactérienne des biofilms (DAPI) en fonction de la vitesse de l'eau.	339
Figure 169: Evolution de la concentration médiane en bactéries _{cultivables} en fonction de la vitesse de l'eau.	342
Figure 170: Evolution de la proportion des bactéries _{cultivables} (bactéries _{cultivables} /bactéries _{totales}) en fonction de la vitesse de l'eau.	345
Figure 171: Evolution de la concentration en Lpn _{totales} (Immunofluorescence) dans les biofilms en fonction de la vitesse de l'eau.	348
Figure 172: Evolution de la proportion de Lpn _{totales} (Immunofluorescence) parmi les bactéries des biofilms en fonction de la vitesse de l'eau.	350
Figure 173: Evolution de la concentration de Lpn _{cultivables} (GVPC) des biofilms en fonction de la vitesse de l'eau.	353
Figure 174 : Evolution des proportions de Lpn _{cultivables} en fonction de la vitesse de l'eau.	355
Figure 175: Evolution de la concentration des flagellés en fonction de la vitesse de l'eau au cours de l'expérience B.	358
Figure 176: Evolution des concentrations en bactéries _{cultivables} en fonction des concentrations en bactéries _{totales} selon la vitesse de l'eau pour chaque expérimentation (n=10).	359
Figure 177 : Evolution des concentrations en Lpn _{totales} en fonction des concentrations en bactéries _{totales} selon la vitesse de l'eau pour chaque expérimentation (n=10).	360
Figure 178 : Evolution des concentrations en Lpn _{cultivables} en fonction des concentrations en bactéries _{totales} selon la vitesse de l'eau pour chaque expérimentation (n=10).	361
Figure 179 : Evolution des concentrations en Lpn _{totales} en fonction des concentrations en bactéries _{cultivables} selon la vitesse de l'eau pour chaque expérimentation (n=10).	362
Figure 180 : Evolution des concentrations en Lpn _{cultivables} en fonction des concentrations en bactéries _{cultivables} selon la vitesse de l'eau pour chaque expérimentation (n=10).	363
Figure 181 : Evolution des proportions de Lpn _{cultivables} en fonction des concentrations en bactéries _{totales} selon la vitesse de l'eau pour chaque expérimentation (n=10).	365
Figure 182: Evolution des concentrations et des proportions en bactéries dans leurs différents états physiologiques en fonction de la concentration en flagellés lors de l'expérience B (n=9).	366
Figure 183: Evolution des concentrations en Lpn totales ou cultivables en fonction de la concentration en flagellés selon la vitesse de l'eau au cours de l'expérience B (n=9).	367
Figure 184: Evolution de la proportion en Lpn totales ou cultivables en fonction de la concentration des flagellés selon la vitesse au cours de l'expérience B (n=9).	368
Figure 185 : Caractéristiques des refroidissements testés au cours des 3 expériences.	376
Figure 186 : Différences de température observées entre l'eau de la bache de rejet et la station Parking à la même période que les 3 expériences en réacteurs.	376
Figure 187: Evolution de la concentration en bactéries _{totales} au cours de l'incubation des biofilms en fonction de la température de l'eau recevant les biofilms. Valeurs médianes des concentrations en bactéries totales pour l'ensemble du suivi, pour la période réunissant les 3 premiers jours, pour la période allant du sixième au vingtième jour ("Riv. réch." : "Rivière réchauffée").	378
Figure 188: Evolution dans le temps de la concentration en bactéries _{cultivables} au cours de l'incubation des biofilms pour les deux températures de l'eau recevant les biofilms. Valeurs médianes des concentrations en bactéries _{cultivables} pour l'ensemble du suivi, pour la période réunissant les 3 premiers jours, pour la période allant du sixième au vingtième jour ("Riv. réch." : "Rivière réchauffée").	382
Figure 189: Evolution de la proportion des bactéries _{cultivables} au cours de l'incubation des biofilms en fonction de la température de l'eau recevant les biofilms. Valeurs médianes des proportions en bactéries _{cultivables} pour l'ensemble du suivi, pour la période réunissant les 3 premiers jours, pour la période allant du sixième au vingtième jour ("Riv. réch." : "Rivière réchauffée").	384
Figure 190: Evolution de la concentration en Lpn _{totales} (immuno) au cours de l'incubation des biofilms en fonction de la température de l'eau recevant les biofilms. Valeurs médianes des concentrations en Lpn _{totales} pour l'ensemble du suivi, pour la période réunissant les 3 premiers jours, pour la période allant du sixième au vingtième jour ("Riv. réch." : "Rivière réchauffée").	386
Figure 191: Evolution de la proportion des Lpn _{totales} au sein du biofilm au cours de l'incubation des biofilms en fonction de la température de l'eau recevant les biofilms. Valeurs médianes des proportions en Lpn _{totales} pour l'ensemble du suivi, pour la période réunissant les 3 premiers jours, pour la période allant du sixième au vingtième jour ("Riv. réch." : "Rivière réchauffée").	388

Figure 192: Evolution de la concentration en $Lpn_{cultivables}$ au cours de l'incubation des biofilms en fonction de la température de l'eau recevant les biofilms. Valeurs médianes des concentrations en $Lpn_{cultivables}$ pour l'ensemble du suivi, pour la période réunissant les 3 premiers jours, pour la période allant du sixième au vingtième jour ("Riv. réch." : "Rivière réchauffée").	390
Figure 193: Evolution de la proportion de Lpn présentes à l'état cultivable dans le biofilm au cours de l'incubation ($Lpn_{cultivables}/Lpn_{totales}$) en fonction de la température de l'eau recevant les biofilms. Valeurs médianes des proportions de Lpn présentes à l'état cultivable pour l'ensemble du suivi, pour la période réunissant les 3 premiers jours, pour la période allant du sixième au vingtième jour ("Riv. réch." : "Rivière réchauffée").	392
Figure 194 : Evolution de la concentration des protistes dans le biofilm au cours de l'incubation en fonction de la température de l'eau recevant les biofilms. Valeurs médianes des proportions des protistes pour l'ensemble du suivi, pour la période réunissant les 3 premiers jours, pour la période allant du sixième au vingtième jour ("Riv. réch." : "Rivière réchauffée").	393
Figure 195: Evolution de la concentration en ciliés au cours de l'incubation des biofilms en fonction de la température de l'eau recevant les biofilms. Valeurs médianes des concentrations en ciliés pour l'ensemble du suivi, pour la période réunissant les 3 premiers jours, pour la période allant du sixième au vingtième jour ("Riv. réch." : "Rivière réchauffée").	395
Figure 196: Evolution de la concentration en amibes au cours de l'incubation des biofilms en fonction de la température de l'eau recevant les biofilms. Valeurs médianes des concentrations en amibes pour l'ensemble du suivi, pour la période réunissant les 3 premiers jours, pour la période allant du sixième au vingtième jour ("Riv. réch." : "Rivière réchauffée").	396
Figure 197: Evolution de la concentration en flagellés au cours de l'incubation des biofilms en fonction de la température de l'eau. Valeurs médianes des concentrations en flagellés pour l'ensemble du suivi, pour la période réunissant les 3 premiers jours et pour la période allant du sixième au vingtième jour ("Riv. réch." : "Rivière réchauffée").	398
Figure 198: Proportions relatives des 3 groupes de protistes au cours de la période d'incubation dans les réacteurs "Rivière" (à gauche) et "Rivière réchauffée" (à droite) pour les 3 expériences (les amibes sont représentées en bleu, les ciliés en rouge et les flagellés en vert).	400
Figure 199: Relation entre les concentrations en Lpn sous différents états physiologiques (cultivables ou totales) et la concentration en bactéries _{totales} (DAPI) sur l'ensemble des données (n=60) : les 3 expériences (A,B,C), les échantillons "Rivière" (témoins, T) et "Rivière réchauffée" (essais, E) à chaque date de prélèvement (0 à 20).	403
Figure 200: Relation entre les concentrations de bactéries _{cultivables} et les concentrations de protistes et plus précisément d'amibes	405
Figure 201: Emplacements des sites impliqués dans le modèle pluie-débit (Image Google Earth).	410
Figure 202: Schéma de fonctionnement du modèle CANOE	413
Figure 203: Hyétogramme de la campagne de prélèvement du mois de mai 2009 (à gauche) et hydrogramme correspondant obtenu après modélisation (à droite)	415
Figure 204: Effet de la durée d'exposition du filet sur la mesure de la matière sèche (A. QUAY)	417
Figure 205: Evolution de l'importance de la fraction organique transportée en période d'étiage (A) et en fonction du débit maximal en période de crue (B)	417
Figure 206: Concentration en Bactéries _{totales} (A) et en $Lpn_{totales}$ (B) dans les biofilms en fonction du débit médian modélisé sur la période d'incubation	419

Tableau 1 : Avantages et désavantages des différentes techniques basées sur la fluorescence pour la détermination de l'état physiologique des cellules dans des études environnementales (Lew, et al., 2010)	43
Tableau 2 : Principales espèces de protistes permettant la multiplication intracellulaire de Lpn (Lau & Ashbolt, 2009)	48
Tableau 3 : Surface du bassin versant des principaux affluents du lac du Bourget	94
Tableau 4 : Périodes d'incubation des substrats artificiels pour chaque station au cours des 9 campagnes de prélèvement	100
Tableau 5: Périodes d'incubation des substrats artificiels pour chaque station au cours des 6 campagnes effectuées sur le réseau aixois	104
Tableau 6: Caractéristiques physico-chimiques des eaux des sources thermales et de la rivière la Chaudanne entre le 15/08/2005 et le 15/08/2006 (Données S. Gallino)	106

Tableau 7: Composition du milieu TSA.....	118
Tableau 8 : Composition du milieu GVPC utilisé pour le dénombrement des $Lpn_{cultivables}$	119
Tableau 9 : Composition du milieu de culture utilisé pour le dénombrement des "Pseudomonas _{cultivables} et bactéries apparentées".....	120
Tableau 10 : Périodes d'enregistrements des débits "exploitables" à chacune des stations équipées d'un limnigraphe.....	128
Tableau 11: Evolution de la variabilité (MAD/Médiane) inter-réplicats du poids sec des biofilms en fonction du type de substrat par campagne et par station (CV_{MAD}).....	135
Tableau 12: Gamme de valeur des descripteurs du biofilm (Poids sec, Matière organique, Proportion de Matière organique) pour chaque campagne en fonction du substrat.....	136
Tableau 13 : Comparaison du poids sec du biofilm (p-values ; test de Mann Whitney).....	137
Tableau 14: Evolution de la variabilité (MAD/Médiane) inter-réplicats de la matière organique des biofilms en fonction du type de substrat par campagne et par station (CV_{MAD}).....	138
Tableau 15 : Comparaison de la valeur de la matière organique du biofilm (p-values ; test de Mann Whitney).....	139
Tableau 16 : Evolution de la variabilité (MAD/Médiane) inter-réplicats de la proportion de matière organique (Matière organique/Poids sec) des biofilms en fonction du type de substrat par campagne et par station (CV_{MAD}).....	140
Tableau 17 : Comparaison de la proportion de la matière organique (Matière organique/Poids sec) du biofilm....	142
Tableau 18 : Evolution de la variabilité (MAD/Médiane) inter-réplicats de la concentration en bactéries totales (DAPI) des biofilms en fonction du type de substrat par campagne et par station (CV_{MAD}).....	144
Tableau 19 : Gammes des concentrations des bactéries totales et cultivables ; gamme des proportions des bactéries _{cultivables}	145
Tableau 20: Comparaison de la concentration des bactéries _{totales}	145
Tableau 21 : Evolution de la variabilité (MAD/Médiane) inter-réplicats de la concentration en bactéries _{cultivables} des biofilms en fonction du type de substrat par campagne et par station (CV_{MAD}).....	146
Tableau 22: Comparaison de la concentration des bactéries _{cultivables}	147
Tableau 23 : Evolution de la variabilité (MAD/Médiane) inter-réplicats de la proportion en bactéries _{cultivables} (Bactéries _{cultivables} /Bactéries _{totales}) des biofilms en fonction du type de substrat par campagne et par station (CV_{MAD}).....	149
Tableau 24: Comparaison de la proportion de bactéries _{cultivables}	150
Tableau 25 : Evolution de l'hétérogénéité inter-réplicats de la concentration en $Lpn_{totales}$ (Immuno) des biofilms en fonction du type de substrat par campagne et par station (CV_{MAD}).....	152
Tableau 26: Gamme de concentration des différentes formes de Lpn (totales, FISH) et de leurs proportions en fonction du type de substrat.....	153
Tableau 27: Comparaison de la concentration de $Lpn_{totales}$	154
Tableau 28 : Evolution de la variabilité (MAD/Médiane) inter-réplicats de la proportion des $Lpn_{totales}$ ($Lpn_{totales}$ /Bactéries _{totales}) en fonction du type de substrat par campagne et par station (CV_{MAD}).....	155
Tableau 29: Comparaison de la proportion de $Lpn_{totales}$	156
Tableau 30 : Evolution de la variabilité (MAD/Médiane) inter-réplicats de la concentration en Lpn_{FISH} des biofilms en fonction du type de substrat par campagne et par station (CV_{MAD}).....	157
Tableau 31: Comparaison de la concentration de Lpn_{FISH}	159
Tableau 32 : Evolution de la variabilité (MAD/Médiane) inter-réplicats de la proportion en Lpn_{FISH} (Lpn_{FISH} /Bactéries _{totales}) des biofilms en fonction du type de substrat par campagne et par station (CV_{MAD}).....	160
Tableau 33: Comparaison de la proportion de Lpn_{FISH}	161
Tableau 34: Evolution de la variabilité (MAD/Médiane) inter-réplicats du rapport entre les Lpn_{FISH} et les $Lpn_{totales}$ des biofilms en fonction du type de substrat par campagne et par station (CV_{MAD}).....	162
Tableau 35: Comparaison du rapport $Lpn_{FISH} / Lpn_{totales}$	164
Tableau 36 : Comparaison de la concentration et de la proportion de $Lpn_{cultivables}$	165
Tableau 37 : Evolution de la variabilité (MAD/Médiane) inter-réplicats des concentrations d'amibes en fonction du type de substrat par campagne et par station (CV_{MAD}).....	167
Tableau 38: Gammes des concentrations des protistes (amibes et flagellés) par campagne en fonction du type de substrat.....	168
Tableau 39: Comparaison de la concentration des amibes.....	168
Tableau 40: Comparaison de la concentration de ciliés en fonction du type de substrat.....	169
Tableau 41 : Evolution de la variabilité (MAD/Médiane) inter-réplicats des concentrations en flagellés des biofilms en fonction du type de substrat par campagne et par station (CV_{MAD}).....	170

Tableau 42: Comparaison de la concentration de flagellés	171
Tableau 43: Comparaison de la concentration de flagellés autotrophes en fonction du type de substrat.....	172
Tableau 44 : Classement des descripteurs en fonction de l'influence de la nature du substrat.....	173
Tableau 45: Classement des descripteurs en fonction de l'effet du substrat sur leur variabilité inter-annuelle.....	174
Tableau 46 : Classement des descripteurs en fonction de l'effet du substrat sur la variabilité (MAD/Médiane) inter-réplicats.....	174
Tableau 47: Débit médian et coefficient de variation (MAD/Médiane) par station et par période (août 2007).	182
Tableau 48: Coefficient de variation des débits par station et par période (octobre 2007).....	184
Tableau 49 : Coefficient de variation des débits par station et par période (janvier 2008).	186
Tableau 50 : Coefficient de variation des débits par station et par période (mars 2008).	188
Tableau 51 : Coefficient de variation des débits par station et par période (mai 2008).	190
Tableau 52 : Coefficient de variation des débits par station et par période (Juillet 2008).	193
Tableau 53 : Coefficient de variation des débits par station et par période (Octobre 2008).	195
Tableau 54 : Coefficient de variation des débits par station et par période (Janvier 2009).	198
Tableau 55 : Coefficient de variation des débits par station et par période (mai 2009).	201
Tableau 56: Tableau de synthèse des caractéristiques des débits par station et par campagne pour la période précédant l'incubation des biofilms et pour la période d'incubation elle-même.	203
Tableau 57 : Dates correspondant au minimum à un doublement du débit.....	205
Tableau 58 : Dates correspondant au minimum à un ΔQ supérieur à 50% du débit du jour précédent.	207
Tableau 59 : Liste des descripteurs des débits et des biofilms utilisés deux-à-deux dans la recherche de corrélation pour chaque station.....	208
Tableau 60 : Corrélations significatives entre les caractéristiques des débits par station sur l'ensemble des campagnes (Débits médians par période, fréquence des $\Delta Q_j > 100$ ou à 50%, ΔQ_j significatifs et les principales caractéristiques des biofilms (poids sec, concentration de matière organique, proportion de matière organique (%m.o.), concentration de bactéries totales ; n=9).	209
Tableau 61 : Dates correspondant au minimum à un doublement du débit par rapport au débit du jour précédent au cours de la période de pré-incubation.....	210
Tableau 62 : Dates correspondant au minimum à un ΔQ supérieur à 50% du débit du jour précédent	211
Tableau 63 : Liste des descripteurs des débits et de la colonne d'eau utilisés deux-à-deux pour la recherche de corrélation à l'intérieur de chaque station.....	213
Tableau 64 : Corrélations significatives entre les caractéristiques des débits par station sur l'ensemble des campagnes (Débits médians par période, nombre de $\Delta Q_j > 100\%$ ou à 50%, ΔQ_j significatifs, débit et ΔQ lors du prélèvement d'eau servant à l'analyse chimique) et les caractéristiques chimiques dans lesquelles se développent les biofilms (COD, concentrations ioniques, conductivité, pH ; n=9).	214
Tableau 65 : Variabilité (MAD/Médiane) inter-réplicat de la concentration de Lpn_{totales} (immuno).	217
Tableau 66 : Tableau récapitulatif des valeurs minimales, maximales et médianes de la concentration de Lpn_{totales} par station pour l'ensemble des campagnes.....	217
Tableau 67 : Tableau récapitulatif des valeurs minimales, maximales et médianes de la proportion de Lpn_{totales} ($Lpn_{\text{totales}}/Bactéries_{\text{totales}}$) par station pour l'ensemble des campagnes.....	220
Tableau 68 : Tableau récapitulatif des valeurs minimales, maximales et médianes de la concentration de Lpn_{FISH} par station pour l'ensemble des campagnes.....	223
Tableau 69 : Tableau récapitulatif des valeurs minimales, maximales et médianes de la proportion de Lpn_{FISH} par station pour l'ensemble des campagnes.	227
Tableau 70 : Tableau de synthèse des concentrations en $Lpn_{\text{cultivables}}$	228
Tableau 71 : Liste des descripteurs utilisés dans la recherche de corrélations entre les différentes formes de Lpn et les autres descripteurs du biofilms.....	229
Tableau 72 : Corrélations significatives entre les descripteurs de la communauté de Lpn et les autres descripteurs biologiques des biofilms par groupe de stations.	230
Tableau 73 : corrélations entre les descripteurs des Lpn et les descripteurs de l'environnement obtenues par groupes de stations.....	231
Tableau 74 : Tableaux récapitulatifs des caractéristiques des débits de chaque station pour chaque période de chaque campagne d'échantillonnage (ΔQ = variation de débit).....	247
Tableau 75 : Tableau récapitulatif des températures minimales/maximales/médianes pour chaque station au cours de chaque campagne.....	252
Tableau 76 : Variabilité (MAD/Médiane) de la température médiane au cours de la période d'incubation (CV_{MAD} en %)	252

Tableau 77 : Concentrations ioniques au niveau de la station Mirabeau	257
Tableau 78 : Liste des descripteurs utilisés dans l'ACP.....	282
Tableau 79 : Descripteurs caractéristiques des 2 premiers axes de l'ACP.....	283
Tableau 80 : Descripteurs caractéristiques du troisième axe de l'ACP.....	285
Tableau 81 : Liste des descripteurs utilisés au cours de la seconde ACP.....	287
Tableau 82 : Descripteurs caractéristiques des 2 premiers axes de l'ACP.....	288
Tableau 83 : Descripteurs caractéristiques du 3 ^{ème} axe de l'ACP.	290
Tableau 84 : Liste des descripteurs impliqués dans les calculs du coefficient de corrélation τ de Kendall.....	292
Tableau 85 : Caractéristiques du milieu correspondant à la présence de ciliés dans les biofilms des stations Liège, Lepic Aquarium au cours de la période froide.....	307
Tableau 86 : Comparaison des corrélations observées dans chaque groupe de station pour les différents descripteurs de Lpn et/ou des bactéries du groupe "Pseudomonas et bactéries apparentées".	334
Tableau 87 : Dates du transfert des biofilms depuis la bêche de rejet vers les réacteurs (Jour 0) pour chaque vitesse de chaque expérimentation.....	338
Tableau 88 : Variabilité (MAD/Médiane) inter-réplicats de la concentration de bactéries _{totales} (CV _{MAD}).	338
Tableau 89 : Effet du transfert des biofilms dans les réacteurs et de l'ensemble de l'incubation sur les concentrations des bactéries _{totales} pour chaque vitesse de chaque expérience.....	341
Tableau 90 : Variabilité (MAD/Médiane) inter-réplicats de la concentration des bactéries _{cultivables} (CV _{MAD}).....	342
Tableau 91 : Effet du transfert des biofilms dans les réacteurs et de l'ensemble de l'incubation sur les concentrations des bactéries _{cultivables} pour chaque vitesse de chaque expérience.	344
Tableau 92 : Effet du transfert des biofilms dans les réacteurs et de l'ensemble de l'incubation sur les proportions de bactéries _{cultivables} pour chaque vitesse de chaque expérience.....	346
Tableau 93 : Variabilité (MAD/Médiane) inter-réplicats de la concentration de Lpn _{totales} (CV _{MAD}).	347
Tableau 94 : Effet du transfert des biofilms dans les réacteurs et de l'ensemble de l'incubation sur les concentrations des Lpn _{totales} pour chaque vitesse de chaque expérience.....	349
Tableau 95 : Effet du transfert des biofilms dans les réacteurs et de l'ensemble de l'incubation sur les proportions de Lpn _{totales} pour chaque vitesse de chaque expérience.....	351
Tableau 96 : Variabilité (MAD/Médiane) inter-réplicats de la concentration de Lpn _{cultivables} (CV _{MAD}).	352
Tableau 97 : Effet du transfert des biofilms dans les réacteurs et de l'ensemble de l'incubation sur les concentrations des Lpn _{cultivables} pour chaque vitesse de chaque expérience.....	355
Tableau 98 : Effet du transfert des biofilms dans les réacteurs et de l'ensemble de l'incubation sur les proportions de Lpn _{cultivables} pour chaque vitesse de chaque expérience.....	357
Tableau 99 : Effet du transfert des biofilms dans les réacteurs et de l'ensemble de l'incubation sur les concentrations de flagellés pour chaque vitesse de chaque expérience.....	358
Tableau 100 : p-values données par le test de Mann Whitney appliqué à la comparaison des concentrations aux 2 vitesses, des descripteurs suivants : bactéries _{totales} , bactéries _{cultivables} , Lpn _{totales} , Lpn _{cultivables} , flagellés, proportions des bactéries _{cultivables} , des Lpn _{totales} et des Lpn _{cultivables}	370
Tableau 101 : p-values données par le test de Mann Whitney appliqué à la comparaison des concentrations entre les jours J0 et J18, des descripteurs suivants : bactéries _{totales} , bactéries _{cultivables} , Lpn _{totales} , Lpn _{cultivables} , flagellés, proportions des bactéries _{cultivables} , des Lpn _{totales} et des Lpn _{cultivables}	371
Tableau 102 : Caractéristiques thermiques des 3 essais température. Les valeurs reportées dans la dernière colonne sont celles du ΔT (T°C "Rivière réchauffée" - T°C "Rivière").	375
Tableau 103 : Variabilité (MAD/médiane) inter-date des données de concentrations en bactéries _{totales}	377
Tableau 104 : Variabilité (MAD/Médiane) inter-réplicats pour la concentration des bactéries _{totales}	377
Tableau 105 : p-values données par le test de Mann Whitney appliqué à la comparaison des concentrations obtenues dans les biofilms "Rivière" et "Rivière réchauffée", des descripteurs suivants : bactéries _{totales} , bactéries _{cultivables} , Lpn _{totales} , Lpn _{cultivables} , proportions des bactéries _{cultivables} , des Lpn _{totales} et des Lpn _{cultivables} . Le calcul a été fait pour chaque jour et pour chacune des 3 différences de température.	379
Tableau 106 : p-values données par le test de Mann Whitney appliqué à la comparaison des concentrations obtenues dans les biofilms "Rivière" et "Rivière réchauffée", des descripteurs suivants : concentrations d'amibes, de ciliés, de flagellés et de l'ensemble des protistes, ainsi que la proportion de chaque groupe de protistes.....	380
Tableau 107 : Variabilité (MAD/Médiane) inter-date des données de concentrations en bactéries _{cultivables}	381
Tableau 108 : Variabilité (MAD/Médiane) inter-réplicats pour la concentration en bactéries _{cultivables}	381
Tableau 109 : Variabilité (MAD/Médiane) inter-date des données des proportions en bactéries _{cultivables} (Bactéries _{cultivables} /Bactéries _{totales}).....	383

Tableau 110 : Variabilité (MAD/Médiane) inter-réplicats pour la proportion des bactéries _{cultivables} (Bactéries _{cultivables} /Bactéries _{totales}).....	383
Tableau 111 : Variabilité (MAD/Médiane) inter-date des données des concentrations en Lpn _{totales}	385
Tableau 112 : Variabilité (MAD/Médiane) inter-réplicats pour les concentrations en Lpn _{totales}	385
Tableau 113 : Variabilité (MAD/Médiane) inter-date des données des proportions de Lpn _{totales} (Lpn _{totales} /Bactéries _{totales}).....	387
Tableau 114 : Variabilité (MAD/Médiane) inter-réplicats des proportions de Lpn _{totales} (Lpn _{totales} /Bactéries _{totales}).....	387
Tableau 115 : Variabilité (MAD/Médiane) inter-date des données des concentrations de Lpn _{cultivables}	389
Tableau 116 : Variabilité (MAD/Médiane) inter-réplicats pour les concentrations de Lpn _{cultivables}	389
Tableau 117 : Variabilité (MAD/médiane) inter-date des proportions de Lpn _{cultivables} (Lpn _{cultivables} /Lpn _{totales}).....	391
Tableau 118 : Variabilité (MAD/Médiane) inter-réplicats des proportions de Lpn _{cultivables} (Lpn _{cultivables} /Lpn _{totales}).....	391
Tableau 119 : Variabilité (MAD/Médiane) inter-date des données des concentrations de protistes.....	392
Tableau 120 : Variabilité (MAD/Médiane) inter-réplicats pour les concentrations des protistes.....	393
Tableau 121 : Variabilité (MAD/Médiane) inter-date des données des concentrations d'amibes.....	395
Tableau 122 : Variabilité (MAD/Médiane) inter-réplicats pour les concentrations d'amibes.....	396
Tableau 123 : Variabilité (MAD/Médiane) inter-date des données des concentrations de flagellés.....	397
Tableau 124 : Variabilité (MAD/Médiane) inter-réplicats des concentrations de flagellés.....	398
Tableau 125 : Corrélations significatives entre les descripteurs obtenus par le calcul du τ de Kendall, sur l'ensemble des données	402
Tableau 126 : Corrélations significatives obtenues au sein de chacune des expérimentations pour l'ensemble des dates et les échantillons témoins et essais ; en considérant tous les descripteurs deux-à-deux.....	404
Tableau 127 : Comparaison des données obtenues grâce au pluviomètre de la Chambotte par rapport aux enregistrements journaliers du pluviomètre d'Aix-les-Bains lors de différents épisodes orageux au cours de l'été 2007.	412
Tableau 128 : Résultats des tests de validation du calage.....	413
Tableau 129 : Comparaison de l'efficacité de la modélisation en fonction du pluviomètre considéré au cours de 4 événements orageux.....	415
Tableau 130 : Campagnes des volets I et II utilisées pour la détermination du débit seuil.....	418
Tableau 131 : Tableau récapitulatif des gammes de concentrations des bactéries _{totales} et des protistes totaux en fonction du type de substrat et concentrations obtenues sur des biofilms matures dans la bibliographie.....	426

1 - Introduction

L'épidémie de pneumonie qui toucha les légionnaires américains suite au congrès de Philadelphie en 1976, faisant 29 victimes, a conduit à la découverte en 1977 de la bactérie *Legionella pneumophila* (*Lpn*), et a mis en cause le système climatisation de l'hôtel accueillant les victimes comme source de propagation de la bactérie (Fraser et al, 1977 : McDade et al, 1977).

La bactérie *Lpn* est aujourd'hui reconnue comme étant l'agent responsable de la majorité des cas de légionellose (Molmeret, *et al.*, 2005, Diederer, 2008, Joseph, *et al.*, 2010). On retrouve cette bactérie dans de nombreux environnements aquatiques d'origine naturelle, dont les eaux souterraines superficielles et les eaux thermales, mais également d'origine anthropique telles que les fontaines, les réseaux d'eaux chaudes sanitaires, les établissements dédiés aux activités aquatiques, les établissements thermaux-ludiques... (Fliermans *et al.*, 1981; Atlas, 1999). En raison du risque de contamination d'humains, cette bactérie a principalement été étudiée dans les réseaux d'eaux chaudes sanitaires et en laboratoire. A l'inverse peu d'études concernent son écologie et sa présence dans les milieux naturels (Declerck, 2009).

Dans cette étude, nous allons donc nous poser la question de la présence et du devenir de *Lpn* dans l'environnement, et plus particulièrement dans les cours d'eau et les eaux thermales. Nous rechercherons aussi des facteurs de régulations naturels. Pour cela, nous nous placerons à différentes échelles d'étude. Celle, générale, d'un bassin versant dans son ensemble. Celle, plus locale, d'un point de contamination et de l'espace environnant immédiat. L'échelle du laboratoire sera donc logiquement la 3^{ème} échelle à considérer. Elle viendra compléter les deux approches précédentes en permettant une approche plus scientifique grâce à la maîtrise de certains paramètres : de ce point de vue des expériences en microcosmes seront réalisés.

Nous nous attacherons à ne pas considérer uniquement les bactéries cultivables, mais plutôt leurs différentes formes physiologiques en liaison avec l'importance des formes viables non cultivables dans l'environnement. Ceci aura également pour but de comparer différentes techniques utilisées en laboratoire et de tester la pertinence de ces techniques pour évaluer la présence réelle de *Lpn* dans l'environnement compte-tenu de la diversité des facteurs de contrôle et des contraintes qu'elle peut recevoir dans l'environnement.

La dernière particularité de cette étude est la matrice étudiée. Il s'agit, en effet, de biofilms. L'intérêt porté aux formes bactériennes fixées présente différentes justifications. Tout d'abord, les biofilms concentrent la grande majorité des bactéries dans les cours d'eau ((Bryers, 1982, Costerton, *et al.*, 1995, Costerton, 2007, Nikolaev & Plakunov, 2007). De plus, ils permettent une intégration dans le temps des bactéries par rapport à un prélèvement ponctuel dans la colonne d'eau.

A travers les 3 niveaux d'études définis précédemment, nous souhaiterions traiter de différentes problématiques.

L'échelle du bassin versant aura pour but d'évaluer la présence de la bactérie dans les principaux affluents du lac du Bourget. Nous nous intéresserons également aux variations saisonnières des concentrations de *Lpn* et à la recherche de facteurs naturels de régulation. Ce volet nous permettra également de comparer les concentrations des différentes formes de *Lpn* des principaux affluents avec celles de la partie aval de l'un des affluents, le réseau aixois, connu pour recevoir des eaux thermales chargées en *Lpn*.

Le suivi à l'échelle du réseau aixois permettra d'évaluer l'importance des apports en *Lpn* provenant de 2 sources thermales chroniquement contaminées par cette bactérie. Ces deux sources ne sont bien sur plus utilisées par les établissements thermaux, mais elles se déversent dans l'un des affluents du lac du Bourget. Cet affluent, le réseau aixois, est constitué de la Chaudanne puis d'un bras du Tillet. A travers les séries de prélèvements effectuées tout au long de ce réseau (depuis un point situé à l'amont des arrivées d'eau thermale jusqu'au point de confluence avec le Lac du Bourget), nous chercherons à évaluer l'importance et le devenir des *Lpn* à l'aval du point de confluence avec les eaux thermales chargées en *Lpn* au cours des différentes saisons. Ainsi nous chercherons à répondre à un certain nombre de questions. Existe-t-il un processus d'autoépuration des *Lpn*, ou au contraire les bactéries se maintiennent-elles le long du cours d'eau ? Existe-t-il des facteurs naturels de régulation de cette bactérie, facteurs qui seraient spécifiques à ce réseau ? Les chocs thermique et trophique correspondant au passage depuis les eaux thermales vers le cours d'eau permettent-ils d'éliminer *Lpn* ? Les formes cultivables restent-elles dans cet état physiologique après leur arrivée dans le milieu récepteur ? Enfin, nous nous intéresserons aux relations avec une autre espèce bactérienne : *Pseudomonas aeruginosa*, pour laquelle des relations antagonistes ont déjà pu être mise en évidence en laboratoire dans certaines conditions (Declerck, *et al.*, 2005, Guerrieri, *et al.*, 2008).

Les études en mésocosmes auront, quant à elles, pour but d'évaluer l'importance de deux descripteurs particuliers, la vitesse et la température de l'eau, sur l'évolution de biofilms chargés en *Lpn*. Pour cela, des biofilms développés en eaux thermales seront utilisés dans des mésocosmes alimentés par de l'eau de rivière.

Du fait des relations particulières existant entre *Lpn* et certains protistes (multiplication intracellulaire). Les trois grands groupes de protistes seront dénombrés dans l'ensemble des volets décrits précédemment, et des corrélations avec les différentes formes de *Lpn* seront recherchées.

Pour terminer cette étude, nous tenterons de mettre en place un modèle permettant de prévoir des apports massifs de biofilms arrachés et donc des apports potentiels de *Lpn* en direction du lac, de la plage d'Aix-les-Bains ainsi que de son jet d'eau. Ce modèle permettra de donner une alerte et ainsi d'éviter l'utilisation du jet d'eau en cas de risque d'apport de fragments de biofilms potentiellement contaminés en *Lpn* consécutifs à des événements orageux sur le bassin versant du réseau aixois.

<p>Dans chaque partie consacrée à l'étude des données, les principales conclusions sont mises en avant au fil des paragraphes par un style qui leur est réservé, à savoir un encadré et un fond grisé.</p>
--

2 - Synthèse bibliographique

2.1 La bactérie *Legionella pneumophila* (Lpn)

La première identification de la bactérie *Legionella pneumophila* (Lpn) a eu lieu grâce à l'étude d'une épidémie de pneumonie ayant sévi suite au congrès de la Légion Américaine à Philadelphie en juillet 1976. Cette épidémie toucha 182 personnes, faisant 29 victimes, mais sans aucune transmission entre humains. L'agent responsable de cette épidémie, Lpn, n'a pu être isolé et identifié que plusieurs mois plus tard, en 1977, par McDade (Fraser, *et al.*, 1977, McDade, *et al.*, 1977).

Lpn a ensuite été identifiée comme étant l'agent responsable d'au moins quatre épidémies précédentes (Feeley, *et al.*, 1978). Parmi ces 4 épidémies, celle de Pontiac (Michigan) en 1968, où 144 personnes, tous personnels ou visiteurs d'un bureau du département de la santé, furent contaminées ; avec pour symptômes : des fièvres, des myalgies et des symptômes respiratoires mineurs mais sans déclarer de pneumonie. Aucun de ces 144 cas ne fut fatal. Cette forme bénigne, également causée par Lpn est alors appelée fièvre de Pontiac (McDade, *et al.*, 1977). Comme pour la légionellose, l'infection a lieu suite à l'inhalation d'aérosols contaminés (Tossa, *et al.*, 2006).

2.1.1 Généralités sur la bactérie Lpn

Lpn est l'une des 53 espèces actuellement reconnues comme appartenant au genre *Legionella*. Il s'agit d'un bacille Gram négatif appartenant à la famille des γ -protéobactéries (Diederer, 2008, Hilbi, *et al.*, 2010).

2.1.1.1 Composition cellulaire

L'enveloppe de Lpn est typique des bactéries à coloration gram négative. Elle est composée d'une membrane cytoplasmique, d'une couche de peptidoglycane et d'une membrane externe plus ou moins visible en fonction de l'origine des bactéries considérées (tissus pulmonaire ou culture) (Rodgers, 1979, Rodgers & Davey, 1982, Ciesielski, *et al.*, 1986).

Les composants de la membrane externe jouent un rôle important dans les interactions avec les cellules hôtes lors de la réplication intra-cellulaire. Les lipopolysaccharides (LPS) en sont les principaux constituants. Ils présentent 3 régions :

- le lipide A,
- l'oligosaccharide central,
- les chaînes latérales polysaccharidiques.

Ce sont ces dernières, les chaînes latérales, qui déterminent le séro groupe de la bactérie (Ciesielski, *et al.*, 1986, Otten, *et al.*, 1986). La nature des LPS peut être modifiée en fonction des conditions de croissance de Lpn, comme lors du processus de réplication intra-amibienne (Barker, *et al.*, 1993). Le deuxième séro groupe a été isolé en 1979, soit peu de temps après la découverte de Lpn (McKinney, *et al.*, 1979). Depuis 15 séro groupes ont été identifiés (Fields, *et al.*, 2002).

La composition cellulaire en acide gras de Lpn est particulière par rapport aux autres bactéries Gram-, mais elle présente des similarités avec celle des bactéries thermophiles (Moss, *et al.*, 1977, Fliermans, *et al.*, 1981).

Les acides gras saturés dont la chaîne principale contient entre 14 et 17 carbones sont prédominants (81 à 90%), comme c'est le cas lors d'une croissance à 37°C sur gélose BCYE, où l'acide gras principal est un acide 14-méthylpentadécanoïque (i-16:0). Le sérotype influence, quant à lui, les proportions de chacun des principaux acides gras saturés de *Lpn* (Moss, *et al.*, 1977, Mauchline, *et al.*, 1992).

Les conditions de croissance sont importantes pour la composition du contenu en acides gras cellulaire de *Lpn* (Barker, *et al.*, 1993). Une baisse de la température de 37°C à 24°C engendre une réduction progressive de la proportion d'acides gras saturés (i-16:0 et i-14:0 principalement) associée à une augmentation de la proportion d'acides gras insaturés et de phospholipides également constitués d'acides gras insaturés (Mauchline, *et al.*, 1992).

Dans l'environnement, *Lpn* peut utiliser les amibes pour se répliquer (chapitre 2.3.2). Ce processus modifie également la composition en acides gras de *Lpn*. Son contenu cellulaire devient alors riche en acide oléique (acide gras mono-insaturé à 18 carbones) dérivant probablement de la membrane lipidique amibienne (Barker, *et al.*, 1993).

La présence de granules lipidiques dans le cytoplasme de *Lpn* est dépendante de la température : leur concentration est très faible à 24°C et elle est maximale à 30°C, puis elle diminue à nouveau lorsque la température augmente jusqu'à 37°C (Mauchline, *et al.*, 1992).

2.1.1.2 Exigences de *Lpn* vis-à-vis des conditions de culture en laboratoire

Les exigences de *Lpn* vis-à-vis des conditions de culture sont responsables des difficultés rencontrées pour son identification lors des premières épidémies de légionellose et de fièvre de Pontiac.

Lpn requiert pour sa croissance en milieu de culture de la L-cystéine, des ions fer sous la forme de pyrophosphate ferrique par exemple, du pyruvate et de l' α -cétoglutarate. D'autres acides aminés peuvent servir de source d'énergie, c'est le cas de la sérine, de la thréonine, de l'histidine, du tryptophane et de la tyrosine (Feeley, *et al.*, 1978). Alors que la sérine est la principale source de carbone, d'azote et d'énergie, la tyrosine est le nutriment limitant la croissance (Mauchline, *et al.*, 1992). Par contre, cette bactérie n'utilise ni glucose, ni polysaccharides, ni amidon pour sa croissance (Feeley, *et al.*, 1978). La présence de chélateurs (citrate, malate, acide EDTA) tout comme l'absence de vitamines agissent comme des inhibiteurs de la croissance de *Lpn* (Feeley, *et al.*, 1978, Pine, *et al.*, 1979, Kusnetsov, *et al.*, 1996).

Peu de milieu de culture permettent sa croissance (George, *et al.*, 1980). Selon la norme AFNOR NF T90-431, les milieux utilisés sont les milieux solides Buffered Charcoal Yeast Extract (BCYE) et GVPC (BCYE avec ajout d'un complexe d'antibiotiques : Glycine, Vancomycine, Polymyxine B et Cycloheximide). L'ajout des antibiotiques dans le cas du milieu GVPC permet de lui donner une certaine sélectivité. Le charbon actif présent dans ces milieux a une action détoxifiante, il permet la capture du CO₂ et de modifier la tension superficielle (Feeley, *et al.*, 1979). Un bouillon peut également permettre la multiplication de *Lpn*. Il s'agit du milieu AYE (Aces Buffered Yeast Extract).

En plus de ses exigences vis-à-vis de la composition du milieu de culture, *Lpn* nécessite des conditions de culture spécifiques.

Il s'agit d'une bactérie aérobie, aucune croissance n'est observée en conditions anaérobies. L'incubation des milieux de culture doit s'effectuer à l'air ou à une concentration de CO₂ de 2.5% (Feeley, *et al.*, 1979). Une concentration de CO₂ de 5% peut inhiber sa croissance (Jarraud & Freney, 2011). La gamme de pH permettant sa culture est limitée avec un optimum à un pH=6.9. De plus, une forte humidité favorise son développement (Mauchline, *et al.*, 1992).

La température est également un facteur essentiel lors de la culture de *Lpn*. En effet, son optimum thermique se situe autour de 35-37°C mais aucune colonie n'est observable pour des températures inférieures à 25°C ou supérieures à 45°C (Mauchline, *et al.*, 1992). Une répllication extra-cellulaire a tout de même été observée à une température inférieure à 20°C (Söderberg, *et al.*, 2004). Comme cela a été décrit précédemment, la température modifie également la morphologie de *Lpn* (taille, composition cellulaire et membranaire, présence/absence du flagelle) et peut induire le passage entre sa forme répllicative et sa forme infectieuse (chapitre 2.1.1.4.3).

Lpn est capable d'utiliser les nutriments excrétés par d'autres microorganismes dans des systèmes simples. Elle est, par exemple, capable de se développer sur un milieu sans cystéine ni pyrophosphate de fer lorsqu'elle est en association avec *Flavobacterium breve*. Elle est également capable de se développer en association avec des algues. C'est le cas avec les 3 espèces de cyanobactéries suivantes : *Fischerella sp.*, *Phormidium sp.* et *Oscillatoria sp.* (Taylor, 2009). A l'inverse, elle ne semble pas capable d'utiliser les métabolites excrétés par les amibes, lors d'essais en laboratoire (Declerck, *et al.*, 2005).

Par contre, *Lpn* présente un caractère nécrophage, elle est en effet capable de se développer sur des microorganismes tués par la chaleur, qu'ils proviennent de biofilms ou d'un réseau domestique (Temmerman, *et al.*, 2006). Le caractère nécrophage de *Lpn* est influencé par la nature des cellules mortes. En effet, sa croissance est plus importante lorsqu'elle utilise des protistes morts, probablement en raison de leur grande taille cellulaire. Au contraire, les bactéries Gram+ seules ne permettent pas son développement. Il est possible que la solidité de leur membrane en soit la raison : le choc thermique ne les endommage pas et ne permet donc pas la libération du contenu cellulaire dans le milieu (Temmerman, *et al.*, 2006).

Ce caractère nécrophage est important et doit être pris en compte lors des procédures de désinfection de réseaux par la chaleur, car *Lpn* peut ensuite se développer en utilisant la biomasse morte produite durant ce traitement thermique (Temmerman, *et al.*, 2006).

D'un point de vue biochimique, *Lpn* est une bactérie oxidase+, β -lactamase+ et catalase+ (Orrison, *et al.*, 1981). Mais son activité enzymatique peut varier en fonction des conditions environnementales au cours de sa croissance. Ainsi la catalase est inactive ou absente lors d'une croissance à forte température (44°C) et lorsque le taux de croissance est très faible ($<0.03 \text{ h}^{-1}$). Ce phénomène est probablement responsable des observations contradictoires concernant l'activité catalase de *Lpn* (Berg, *et al.*, 1985).

2.1.1.3 Epidémiologie

La forme la plus grave dont *Lpn* peut être responsable est une forme sévère de pneumonie : la légionellose. Les personnes les plus sensibles à cette affection sont les personnes âgées, les fumeurs, ainsi que les personnes immunodéprimées (Hilbi, *et al.*, 2010). Une forme bénigne existe également, il s'agit de la fièvre de Pontiac. Elle se traduit par des symptômes pseudo-grippaux, tels que fièvre, asthénie, myalgie, arthralgie, maux de tête, toux et nausées. Mais ces symptômes disparaissent après 2 à 5 jours sans traitement (Tossa, *et al.*, 2006).

Dans les deux cas, la contamination s'effectue à travers l'inhalation d'aérosols. De plus, aucune transmission entre humain n'a été documentée à ce jour (Abu Kwaik, *et al.*, 1998, Swanson & Hammer, 2000)

La légionellose est une maladie à déclaration obligatoire en France depuis 1987. Au cours des années 2007-2008, 5960 cas de maladie du légionnaire ont été reportés au sein de 34 pays européens. En France, 1540 cas de légionellose ont été reportés en 2010 soit 24 cas par million d'habitants. Le nombre de cas a augmenté de 28% entre 2009 et 2010 après avoir diminué de 21% entre 2005 et 2009 (Campèse, *et al.*, 2011). Les hommes sont plus sensibles que les femmes, le ratio homme/femme était de 3.2 en 2010. L'âge est également un facteur important. L'âge médian était de 62 ans. De plus, les taux d'incidences les plus élevés s'observaient chez les personnes de plus de 80 ans : 74 cas par million d'habitant. Les facteurs de risque connus sont le tabagisme, le diabète, une hémopathie, un cancer ou une immunosuppression. En 2010, le taux de létalité a été de 11.7% (Campèse, *et al.*, 2011). Le taux de fatalité de cette affection dépend de l'état de santé initial du patient ainsi que de la rapidité de sa prise en charge (Joseph, *et al.*, 2010).

La dose minimale d'infection (MID) est encore mal connue pour cette bactérie. Mais cette dose dépend de nombreux facteurs tels que la virulence des bactéries et l'état immunitaire de l'hôte, ce qui rend difficile sa détermination (Borella, *et al.*, 2005, Diederer, 2008).

Lpn est responsable de la majorité des cas de légionelloses (Molmeret, *et al.*, 2005, Steinert, *et al.*, 2007, Diederer, 2008, Joseph, *et al.*, 2010). Comme indiqué dans le chapitre 2.1.1.1, les chaînes latérales des lipopolysaccharides de surface confèrent à la bactérie une partie de ses caractères antigéniques et ont permis de définir des sérogroupes. Le séro groupe 1 est le principal responsable des cas de maladie du légionnaire (98% en 2010 en France). Les autres sérogroupes sont également responsables d'un certain nombre de cas même s'il n'est pas toujours possible de déterminer plus précisément le séro groupe impliqué. Les autres sérogroupes pathogènes sont les sérogroupes 3 (3.2%) et 6 (1.2%) principalement. Des épidémies de plus faible importance ont également été causées par *Lpn* 4 et 8 en Espagne, et par *Lpn* 5 en Finlande (Fallon, 1983, Reyrolle, *et al.*, 2004, Joly, *et al.*, 2006, Joseph, *et al.*, 2010, Campèse, *et al.*, 2011). De plus, *Lpn* n'est pas la seule bactérie du genre *Legionella* à être responsable de cas de légionellose. Parmi les 53 espèces appartenant au genre *Legionella*, seules un tiers d'entre elles ont été associées à des cas de légionelloses. On retrouve alors les espèces suivantes : *L. anisa*, *L. bozemanii*, *L. dumoffi*, *L. gormanii*, *L. longbeachae*, *L. maceachernii* et *L. wadsworthii* (Fry, *et al.*, 2007, Joseph, *et al.*, 2010). L'Australie et la Nouvelle Zélande présentent une particularité : environ 30% des cas ont été associés à *L. longbeachae*, ce qui est fortement supérieur aux observations effectuées en Europe et aux Etats-Unis (Jarraud & Freney, 2011). Le genre *Legionella* inclut également des formes non-cultivables, formes intracellulaires obligatoires des amibes, qui sont également responsables de cas de légionellose. Il s'agit des LLAPs (*Legionella*-like *ameba* pathogens) auxquelles appartiennent les espèces *L. lytica* sp. nov., *L. drozanskii* sp. nov., *L. rowbothamii* sp. nov. et *L. fallonii* qui correspondent respectivement aux souches LLAP-3, LLAP-1, LLAP-6 et LLAP-10 (Adeleke, *et al.*, 1996, Adeleke, *et al.*, 2001, Marrie, *et al.*, 2001).

Les patients atteints de fièvre de Pontiac présentent une séroconversion à *Lpn*, mais la bactérie n'a pu être isolée. Cette forme bénigne peut donc provenir d'une toxine produite par *Lpn*, mais également d'une infection par sa forme non cultivable (Steinert, *et al.*, 1997, Swanson & Hammer, 2000).

La plupart des cas de légionellose sont liés à des environnements aquatiques construits par l'homme. C'est le cas des chauffe-eau, des systèmes de distribution et d'adduction d'eau potable, des bains bouillonnants, des piscines thermales sulfatées ou calciques, des systèmes de climatisation, des tours de refroidissement, des centrales d'humidification, mais aussi des fontaines décoratives, des systèmes d'arrosage et des équipements de thérapie respiratoire et dentaire (Orrison, *et al.*, 1981, Diederer, 2008, Jarraud & Freney, 2011). Dans les réseaux d'eaux chaudes, les bassins de stockages sont les principaux réservoirs de *Lpn*. Les autres bactéries naturellement présentes dans ces bassins pourraient alors apporter la cystéine nécessaire à la croissance de *Lpn* (Stout, *et al.*, 1985). Les TAR et les épurateurs d'air industriels peuvent, quant à eux, être responsables de la dissémination de *Lpn* à travers les aérosols qu'ils créent. Dans le cas des épurateurs d'air, la dissémination grâce aux aérosols peut s'effectuer sur une distance pouvant atteindre une dizaine de kilomètres (Nygård, *et al.*, 2008). *Lpn* a même été mise en évidence dans des flaques situées sur les routes au Japon, et plus particulièrement lors de précipitations importantes en période chaude. Le passage de voiture dans ces flaques peuvent alors causer une aérosolisation de *Lpn* et favoriser la transmission de la légionellose (Sakamoto, *et al.*, 2009). C'est généralement après un transfert du milieu naturel vers un système anthropogène, où la température est supérieure à la température ambiante, que *Lpn* colonise les biofilms existant et se multiplie intensément (Rogers, *et al.*, 1994).

Il a également été remarqué que les épisodes épidémiques de légionellose pouvaient être associés à une grande variété d'émetteurs de l'environnement : tours de refroidissement, spas, machines à glaces, brumisateurs, douches et fontaines. Tandis que les cas sporadiques sont généralement liés au réseau d'eau potable domestique (Schlech, 1990, Atlas, 1999).

2.1.1.4 *Lpn*, une bactérie polymorphe

Les premières descriptions de cette bactérie rendent compte d'un bacille de taille variable aux extrémités plus ou moins arrondies. Sa largeur semble varier entre 0.1 et 1 µm pour une longueur pouvant atteindre 1 à 2 µm. Des formes filamenteuses sont même observables en culture (McDade, *et al.*, 1977, Rodgers, 1979). Son cytoplasme est riche en ribosomes et abrite quelques vacuoles (Pine, *et al.*, 1979). A l'inverse, aucune inclusion ou organelle ne sont visibles (Rodgers, 1979). *Lpn* est une bactérie non-sporulante, ne produisant pas de microcystes (Pine, *et al.*, 1979). Les éléments nucléaires prennent une forme filamenteuse, avec un contenu en G-C est de 39% (Pine, *et al.*, 1979). Un flagelle peut également être observé sur certaines formes de *Lpn* issues de cultures, qu'il s'agisse de bacilles ou de filaments. Ce flagelle se situe généralement dans la région polaire ou subpolaire de la bactérie, mais il peut occasionnellement se situer sur un côté de la bactérie (Rodgers, *et al.*, 1979). Des pili ont également été mis en évidence par coloration négative (Rodgers, *et al.*, 1979, Rodgers & Davey, 1982). *Lpn* est donc une bactérie polymorphe.

Son activité physiologique varie également en fonction des conditions environnementales.

En milieu de culture, *Lpn* alterne entre une forme répliquative non mobile et une forme flagellée, infectieuse pour certains protistes et des macrophages. Dans des conditions favorables, et donc en phase de croissance exponentielle, la bactérie s'allonge pour former de longs bacilles, pouvant aller jusqu'à une forme filamenteuse. Sa membrane externe est lisse. Cette forme se réplique intensément et peut former des amas, suite à la modification du caractère hydrophobe et de l'adhérence entre les bactéries. Sous cette forme, *Lpn* est résistante au chlorure de sodium, peu toxique, mais sensible aux différents stress. Il s'agit de la forme répliquative de *Lpn* (Pine, *et al.*, 1979, Cirillo, *et al.*, 1994, Steinert, *et al.*, 2002, Greub & Raoult, 2003, Molofsky & Swanson, 2004, Piao, *et al.*, 2006, Hilbi, *et al.*, 2010).

A l'inverse, la forme transmissive, également appelée forme infectieuse ou forme en phase stationnaire, est rencontrée lorsque l'environnement, ou le milieu de culture, s'appauvrit et se trouve carencé en acides aminés, comme c'est le cas lorsqu'une culture de *Lpn* atteint la phase stationnaire de croissance. *Lpn* prend alors la forme de bâtonnets courts et épais, avec un ou deux flagelles en position subpolaire. Dans cet état, *Lpn* est alors sensible au chlorure de sodium, cytotoxique et résistante au stress (Pine, *et al.*, 1979, Rodgers & Davey, 1982, Cirillo, *et al.*, 1994, Hales & Shuman, 1999, Steinert, *et al.*, 2002, Heuner & Steinert, 2003, Molofsky & Swanson, 2004, Hilbi, *et al.*, 2010).

Lpn prend une troisième forme lorsqu'elle se réplique dans une cellule hôte (protistes, macrophage, cellules HeLa) (cf. chap. 2.3.2). Cette forme est appelée forme intra-cellulaire mature (MIF) et ressemble à la forme infectieuse obtenue sur milieu de culture. Les MIF sont des formes exclusivement intra-cellulaires, sans respiration apparente, présentant un profil protéique ainsi qu'une structure membranaire uniques. Sous cette forme, la bactérie est résistante à certains antibiotiques et détergents. Sa surface se trouve enrichie en Hsp60, protéine de 60 kDa dont le rôle initial est de préserver les protéines de dommages relatifs aux températures élevées.

Lpn devient 10 fois plus infectieuse sous cette forme que sous sa forme transmissive. Ces deux formes présentent tout de même certaines similarités telles que la survie dans de l'eau distillée, une résistance aux chocs osmotiques et au traitement à la protéinase K, une tolérance thermique, ainsi que le développement d'inclusions cytoplasmiques et d'invagination de la membrane cytoplasmique. Ces deux formes sont également capables d'induire la synthèse d'un flagelle et de facteurs cytotoxiques en association avec leur caractère infectieux et sont dotées d'une tolérance thermique. La forme transmissive serait une forme intermédiaire entre la forme répliquative et la MIF (Faulkner & Garduno, 2002, Garduno, *et al.*, 2002)

2.1.1.4.1 Gènes impliqués dans le système de régulation de l'expression des caractères transmissifs

Je ne pouvais pas ne pas évoquer l'aspect moléculaire et cellulaire de certains processus. L'échelle de notre étude a été celle des organismes et des systèmes entiers, qui déterminent au moins en partie l'orientation des processus moléculaires. De ce fait, il m'a paru utile d'évoquer les éléments principaux aux niveaux desquels les deux domaines peuvent se rencontrer.

Le changement de forme de *Lpn* correspond logiquement à un changement majeur dans l'expression des gènes. En phase répliquative, ce sont les composants du métabolisme aérobie et du catabolisme des acides aminés et des glucides qui s'expriment. A l'inverse, en phase stationnaire, il s'agit des gènes facilitant la propagation (motilité) et la transmission à un nouvel hôte. Ces derniers incluent les gènes codant pour le flagelle, pour la machinerie des pili de type IV, ainsi que des facteurs de virulence Dot/Icm dépendants et indépendants (Tiaden, *et al.*, 2007, Spirig, *et al.*, 2008).

2.1.1.4.1.1 Le régulon flagelle

Le flagelle de *Lpn* a une structure striée et hélicoïdale. Il est composé de l'assemblage de sous-unités de flagelline, d'environ 48 kDa chacune, codées par le gène *flaA*. L'expression du gène *flaA* est directement régulée par le facteur sigma FliA. Mais elle est également sous l'influence d'un facteur de régulation négatif, *flaR*, qui code pour une protéine de liaison à l'ADN se fixant au niveau du promoteur du gène *flaA* de manière à empêcher la fixation du facteur sigma FliA. (Samrakandi, *et al.*, 2002, Heuner & Steinert, 2003). Les facteurs sigma RpoS et RpoN sont capables d'induire la transcription de *fliA* et donc indirectement la synthèse du flagelle (Bachman & Swanson, 2004). En plus du gène *flaA*, la protéine FliA semble réguler d'autres facteurs de virulence chez *Lpn* (Heuner, *et al.*, 2002).

D'autres gènes participent à la régulation de la production du flagelle. C'est le cas, entre autres, du gène *csrA* (carbon storage regulator) dont l'expression inhibe la production du flagelle. CsrA se fixe sur les ARN, il est considéré comme un répresseur global des caractères de transmission (sensibilité au sodium, cytotoxicité, résistance au stress, évasion de la voie lysosomale...) mais il s'agit aussi d'un activateur essentiel de la réplication (Heuner, *et al.*, 1995, Heuner, *et al.*, 2002, Heuner & Steinert, 2003, Tiaden, *et al.*, 2007, Tiaden, *et al.*, 2010).

2.1.1.4.1.2 Le système LetA/S

Le passage de la phase répllicative à la phase infectieuse s'effectue par l'intermédiaire de différents systèmes de régulation, qui sont interconnectés. La régulation du gène *flaA*, présentée précédemment en fait partie (Byrne & Swanson, 1998, Hales & Shuman, 1999, Hammer & Swanson, 1999, Bachman & Swanson, 2001, Steinert, *et al.*, 2002, Bachman & Swanson, 2004, Molofsky & Swanson, 2004, Tiaden, *et al.*, 2010).

Parmi ces systèmes, le système à 2 composants LetA/S est impliqué dans l'induction du phénotype transmissif, c'est à dire : la motilité, la sensibilité au sodium, l'évasion des lysosomes, l'activation de la cytotoxicité, la pigmentation, la résistance à la chaleur et au stress osmotique, ainsi que dans le rétrécissement des cellules (Bachman & Swanson, 2004). Une autre protéine, LetE, stimule également l'expression des traits de transmission dépendant de LetA/S (Bachman & Swanson, 2004).

L'action de LetA/S s'effectue à travers la levée de la répression de CsrA, et en activant donc indirectement le phénotype de transmission à travers des voies dépendantes et indépendantes du facteur sigma FliA. (Bachman & Swanson, 2004).

2.1.1.4.1.3 Le facteur sigma RpoS

Le facteur sigma RpoS est un facteur sigma de la phase stationnaire qui coordonne l'expression des traits de virulence. Il active donc l'expression des gènes qui confèrent la sensibilité au sodium, ainsi que l'expression du facteur sigma FliA et donc indirectement du gène *flaA* responsable de l'apparition du flagelle. RpoS fournit également à *Lpn* sa capacité à éviter la voie endosomale classique lui permettant ainsi d'effectuer le processus de réplication intra-cellulaire, en particulier chez *A. castellanii*, mais aussi en induisant l'expression du gène *mip* nécessaire à la réplication dans les macrophages. Ce facteur sigma est sujet au contrôle post-transcriptionnel. Lorsque *Lpn* est sous sa forme répllicative, le gène *rpoS* est transcrit en grande quantité fournissant un stock d'ARNm de rpoS disponible pour la cellule. *Lpn* est alors capable de répondre rapidement en cas de dégradation des conditions environnementales (Byrne & Swanson, 1998, Hales & Shuman, 1999, Hammer & Swanson, 1999, Bachman & Swanson, 2001, Steinert, *et al.*, 2002, Bachman & Swanson, 2004, Molofsky & Swanson, 2004, Tiaden, *et al.*, 2010).

Le facteur sigma RpoS est impliqué dans les processus de régulation du phénotype transmissif chez les deux formes de *Lpn* : sa répression en phase répllicative et son activation lors du passage en phase transmissive (Bachman & Swanson, 2004).

2.1.1.4.1.4 Les gènes *lqs*

Le gène *lqsR* (*Legionella* *quorum* *sensing*) est lui aussi impliqué dans le changement de forme de *Lpn*. Il appartient au groupe de gènes *lqs* composés des gènes *lqsA*, *lqsR*, *lqsS* et *hdeD* (Tiaden, *et al.*, 2010). Ce groupe de gènes est homologue aux gènes du système de *quorum sensing* *cqsAS* de *Vibrio cholerae*. Présent dans l'ensemble des souches de *Lpn* séquencées, ce groupe de gènes s'exprime en phase transmissive (Tiaden, *et al.*, 2007, Tiaden, *et al.*, 2010).

Ce groupe de gènes code pour une auto-inducteur synthase (*lqsA*), un détecteur de type kinase (*lqsS*) un régulateur de réponse (*lqsR*) tandis que la fonction de *HdeD* reste actuellement inconnue. Cette dernière est similaire à la protéine *HdeD* de *E. coli* (Tiaden, *et al.*, 2007, Tiaden, *et al.*, 2010).

LqsA produit une molécule signal diffusible du type α -hydroxyketone (AHK) : le 3-hydroxy-pentadecan-4-one. Egalement appelée LAI-1 (*Legionella* *AutoInducer1*), cette molécule signal déclenche l'expression de gènes dans différentes souches bactériennes, en interagissant directement avec le régulateur de réponse (*LqsR*) présent dans le cytoplasme de la bactérie ou avec son détecteur *LqsS* situé dans la membrane interne de *Lpn*. *LqsS* transmet ensuite le signal par une cascade de phosphorylation : un phosphate est ainsi transféré directement ou indirectement à l'aspartate du domaine récepteur du régulateur de réponse *LqsR* ou d'autres régulateurs (Spirig, *et al.*, 2008, Tiaden, *et al.*, 2010, Tiaden, *et al.*, 2010). Comme un grand nombre de bactéries environnementales abritent un système *Lqs* ou *Cqs*, les signaux AHK peuvent donc être communs à différentes espèces ou genres bactériens et être utilisés dans les processus de communication inter- ou intra-spécifiques (système de quorum sensing) (Tiaden, *et al.*, 2010).

La production de *LqsR* (régulateur de réponse) requiert RpoS et donc également, mais en moindre mesure, LetA. Il est également régulé au niveau post-transcriptionnel par les ARN non codants *rsmY* et *rsmZ* et par *CsrA* (Tiaden, *et al.*, 2007, Tiaden, *et al.*, 2010).

Il joue un rôle important dans les interactions entre le pathogène et le phagocyte et dans l'expression des autres traits de transmission. Il est en effet impliqué dans l'acquisition de vésicules dérivées du réticulum endoplasmique et la formation des vacuoles de répllication à la fois chez *Acanthamoeba castellanii*, chez *Dictyostelium discoideum* et dans les macrophages. Il est également responsable de la sensibilité au sel de la forme transmissive et intervient dans la régulation des facteurs de virulence. *LqsR* régule également *flaA* mais de manière négligeable, et ne semble donc pas affecter la formation du flagelle (Tiaden, *et al.*, 2007).

2.1.1.4.2 Fonctionnement du système de régulation de l'expression des caractères transmissifs

Les conditions environnementales, à travers une carence en acides aminés et/ou une baisse de température, engendrent l'activation de l'enzyme RelA, qui est une guanosine-3',5'-bispyrophosphate synthétase responsable d'une accumulation de guanosine 3',5'-bispyrophosphate (ppGpp). Ce ppGpp est considéré comme un messenger secondaire intra-cellulaire. Il est également appelé « alarmone » et induit l'expression des facteurs sigma RpoS, RpoN et FlhA présentés précédemment ainsi que le système LetA/S (Byrne & Swanson, 1998, Hales & Shuman, 1999, Hammer & Swanson, 1999, Bachman & Swanson, 2001, Steinert, *et al.*, 2002, Bachman & Swanson, 2004, Molofsky & Swanson, 2004, Tiaden, *et al.*, 2010).

Les facteurs sigma RpoS et RpoN sont capables d'induire la transcription de *fliA* et donc indirectement la synthèse du flagelle (Bachman & Swanson, 2004). Le système de régulation LetA/S dissipe la répression de CsrA sur les différents traits de transmission (Figure 1). La levée de la répression de CsrA, s'effectue de concert avec l'expression de petits ARN non codants (*rsmY* et *rsmZ*) et de la protéine Hfq (protéine chaperonne des ARNr) (Tiaden, *et al.*, 2010).

Simultanément, RpoS et LetA permettent l'expression du régulateur de réponse LqsR. D'autres signaux, comme les auto-inducteurs (LAI-1) ou la cascade de phosphorylation engendrée par LqsS après fixation de LAI-1 (transduction du signal) peuvent également permettre l'activation de LqsR (Tiaden, *et al.*, 2007, Tiaden, *et al.*, 2010).

Une fois activé, LqsR est impliqué dans l'inhibition des caractères réplcatifs (dont la division cellulaire elle-même), et des filaments extra-cellulaires ainsi que dans l'induction des caractères de virulence et de motilité. En effet, LqsR augmente la sensibilité à NaCl, et favorise la phagocytose, la mise en place de la vacuole réplcative, et de la cytotoxicité. LqsR peut également inhiber CsrA, qui est, rappelons-le un inhibiteur global des caractères de transmission (Tiaden, *et al.*, 2007, Tiaden, *et al.*, 2010).

L'ensemble des gènes *lsq* agissent en synergie à la fois sur la morphologie de *Lpn* et l'expression de ses caractères de transmissions incluant la virulence. Seul *hdeD* ne semble pas participer à ces phénotypes (Tiaden, *et al.*, 2008, Tiaden, *et al.*, 2010).

Notons également l'existence des gènes regroupés en un îlot génétique, qui sont régulés par LqsA et LqsS. Il s'agit d'une région de 133 kb, divisée en deux régions codant entre autres pour des composants des pili pour la région I ; une ATP synthase, et de multiples pompes à efflux spécifiques de différentes espèces d'ions métalliques pour la région II. Mais ces gènes ne sont pas nécessaires à la survie dans les macrophages et les amibes. Il est possible que ces pompes aient un rôle important au cours du cycle de vie de *Lpn*. Des copies de ces gènes peuvent exister sur le chromosome et jouer un rôle dans la survie intra-cellulaire (Kim, *et al.*, 2009, Tiaden, *et al.*, 2010, Tiaden, *et al.*, 2010).

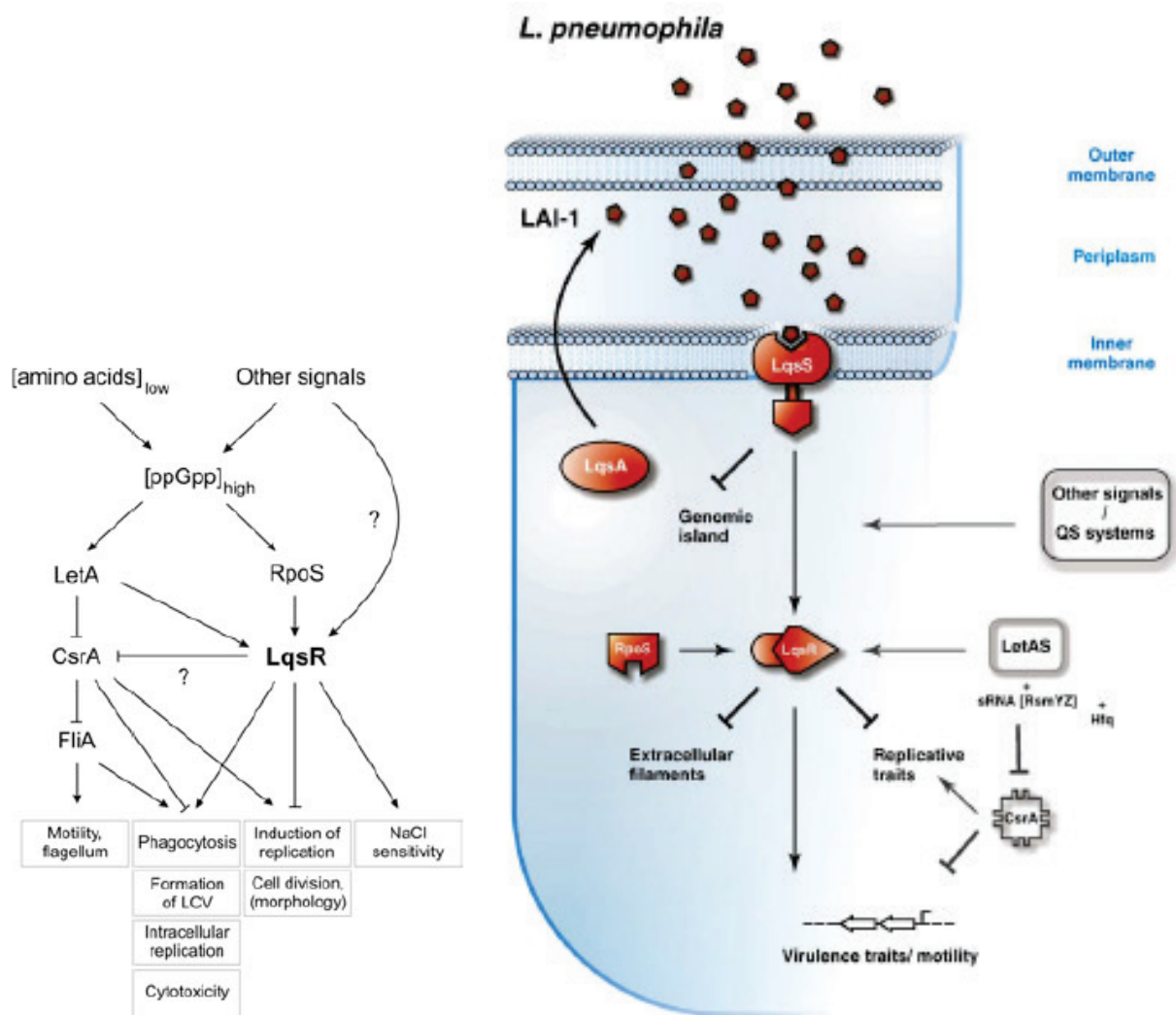


Figure 1: Modèle de régulation des traits de virulence (à gauche) et plus particulièrement du système *lqs* (à droite) (Tiaden, et al., 2010)

En résumé, lorsque les conditions sont favorables à la croissance de *Lpn*, les gènes de transmission de *Lpn* sont peu demandés et donc réprimés par CsrA et RpoS. A l'inverse, lorsque la concentration en acides aminés devient limitante, les gènes des caractères de transmission sont fortement demandés, et passent sous un contrôle positif de la part de LetA/S, LetE, FliA et RpoS (Bachman & Swanson, 2001, Molofsky & Swanson, 2003, Bachman & Swanson, 2004).

2.1.1.4.3 Autres facteurs influençant la morphologie de *Lpn*

Comme la concentration en acides aminés, la température influence la morphologie de *Lpn* (forme répliquative ou infectieuse) ainsi que la présence du flagelle. En effet, à 24°C *Lpn* prend la forme de petit bâtonnet avec un flagelle en position sub-polaire, tandis qu'à 37°C ce flagelle disparaît. La production des sous-unités de flagelline et leur assemblage sont alors plus intenses à 30°C qu'à 37°C (Ott, et al., 1991, Heuner, et al., 1995). Pour des températures comprises entre 30 et 41°C, le pourcentage de bactéries possédant un flagelle diminue avec l'augmentation de la température (Ott, et al., 1991). L'expression de *flaA* est réprimée à une température supérieure à 37°C (Heuner, et al., 1999). Parallèlement, la cellule va s'allonger pour passer de 0.25 µm à 0.4 µm à 37°C (Mauchline, et al., 1992).

En plus de la température et de la concentration en acides aminés, l'expression de *flaA*, et donc la présence du flagelle dépend également de l'osmolarité et de la viscosité. Une forte osmolarité induit l'expression de *flaA*, surmontant la répression de son expression observée normalement lorsque de *Lpn* est sous sa forme répllicative. Ceci permet alors à *Lpn* de s'échapper d'un environnement défavorable. A l'inverse, l'augmentation de la viscosité inhibe la production de flagelline, causant une perte de motilité de *Lpn* (Heuner, *et al.*, 1999).

A une température de 37°C en milieu liquide, ou après des repiquages successifs, *Lpn* prend une forme filamenteuse. Le passage à un état filamenteux chez les bactéries est généralement associé à des anomalies physiologiques telles que des mutations ou une surexpression de certaines protéines. Il apparaît que, dans ces cellules, la réplication de l'ADN a eu lieu alors que la cellule n'a pas fini sa division. Il se forme ainsi un filament multinucléé. Ce phénomène est généralement une réponse à des conditions défavorables chez d'autres espèces, mais chez *Lpn*, il apparaît dans des conditions favorables (Piao, *et al.*, 2006).

2.1.2 *Lpn* à l'état viable non cultivable

Comme de nombreuses autres espèces bactériennes, *Lpn* est capable, lorsque les conditions se dégradent, de passer à un état viable mais non cultivable (VBNC). Sous cette forme, les bactéries deviennent incapables de former des colonies sur les milieux gélosés habituellement utilisés, mais elles sont ensuite capables de retourner à un état cultivable.

2.1.2.1 L'état VBNC

Cet état a été découvert par Xu *et al.*, en 1982, sur la bactérie *Vibrio fischeri* (Kell, Kaprelyants *et al.* 1998). C'est un état physiologique différent de l'état de survie. En effet, en état de survie, les bactéries diminuent fortement leur métabolisme tout en restant cultivables. Plus de 60 espèces bactériennes, dont la plupart sont pathogènes, présentent une forme VBNC (Oliver, 2005).

Les bactéries entrent dans l'état VBNC en réponse à différents stress naturels, tels une carence, une incubation effectuée en dehors de la gamme de température de croissance, ou un milieu de culture inadapté, une augmentation de la pression osmotique, ou encore une exposition à la lumière blanche (Oliver, 2005). L'aérosolisation permet également le passage à un état VBNC chez certaines bactéries Gram- telles que *Serratia marcescens*, *Klebsiella planticola* et *Cytophaga allerginae* (Heidelberg, *et al.*, 1997).

Dans cet état, les cellules maintiennent leur intégrité membranaire malgré des modifications de leur composition (McDougald, *et al.*, 1998). Ces modifications au niveau membranaires permettent aux bactéries VBNC de se maintenir à long-terme et donc de persister dans des conditions défavorables. Chez certaines espèces, la quantité d'ADN des cellules n'est pas influencée par le passage à l'état VBNC tandis qu'elle diminue chez d'autres espèces. La perte de l'activité se traduit logiquement par une baisse de la transcription de l'ADN et par conséquent une diminution de la quantité d'ARN (McDougald, *et al.*, 1998).

Le maintien de la virulence chez les espèces pathogènes non cultivables dépend de l'espèce concernée et des conditions du milieu (Steinert, *et al.*, 1997). Ceci peut permettre d'expliquer la poursuite de la progression d'une maladie après la perte de la capacité du pathogène à se répliquer (Barer & Harwood, 1999). Les formes VBNC de *Lpn* ne semblent pas virulentes sur des cellules porcines, ce qui n'exclut pas une virulence vis-à-vis des macrophages et donc des humains (Steinert, *et al.*, 1997). Il est même possible que l'état VBNC de *Lpn* soit responsable des cas de fièvre de Pontiac. Par contre, les formes initialement VBNC mais qui ont été ressuscitées par réplication intra-amibienne voient leur virulence accrue. L'état VBNC peut donc constituer un réservoir mal connu pour les infections (Steinert, *et al.*, 1997).

Selon McDougald *et al.* (1998), la formation de VBNC pourrait s'effectuer en 2 étapes : la première serait une transition vers l'état VBNC avec à la fois une perte du caractère cultivable et un maintien de l'intégrité cellulaire et des acides nucléiques ; la seconde étape étant la perte progressive de l'intégrité cellulaire et la dégradation du contenu en ARN voire en ADN, pouvant même mener à terme à une perte de la viabilité.

Pour que cet état ait une signification en termes de survie, il faut que les bactéries puissent retourner à un état cultivable. C'est le processus de ressuscitation. La méthode de ressuscitation est également variable en fonction des espèces bactériennes concernées. Il peut s'agir par exemple d'un ajout de nutriments, d'une modification de la température, mais également du passage par un animal (McDougald, *et al.*, 1998).

La plupart des études basées sur le processus de ressuscitation sont ouvertes à des critiques. Car, dans la plupart des cas, l'augmentation du nombre de cellules peut provenir de ce processus de ressuscitation, mais aussi de la croissance de quelques cellules viables présentes dans l'échantillon de départ mais à une concentration inférieure au seuil de détection de ces cellules (Barer & Harwood, 1999). Ces critiques sont donc liées à l'importance de l'hétérogénéité de l'état physiologique d'une population bactérienne, mais aussi à notre incapacité à prouver qu'une cellule dans un état physiologique donné, identifiée par une technique spécifique, soit ensuite capable de grandir et de se diviser (Joux & Lebaron, 2000). Des mesures par cytométrie en flux couplées à un marquage Syto9 - iodure de propidium permettent de visualiser les formes VBNC sans être soumises aux critiques précédentes. Trois régions distinctes ont été mises en évidence sur le cytogramme (Allegra, *et al.*, 2008):

- la région P1 qui contient les cellules ayant perdu leur intégrité membranaire, marquées à l'iodure de propidium. Elles sont non cultivables, non infectieuses pour les amibes et n'ont aucune activité métabolique. Il s'agit des cellules mortes.
- La région P2 qui contient des cellules avec des membranes intactes marquées au Syto9. La majorité de ces cellules sont cultivables, infectieuses pour les amibes et capables de produire de grandes quantités d'ADN.
- La région P3 qui contient des cellules dans un état physiologique intermédiaire, c'est-à-dire qui restent vivantes mais dont les membranes commencent à se détériorer. Ces cellules ne sont pas cultivables, mais certaines restent viables avec une activité métabolique qui peut être détectée et une capacité à être ressuscitées après multiplication intracellulaire dans *A. polyphaga*.

Cette technique permet de caractériser les formes VBNC du genre *Legionella*. Elle pourra être couplée à une séparation immunomagnétique pour une détection spécifique des différents états de ce genre bactérien dans des échantillons environnementaux complexes (Allegra, *et al.*, 2008).

Dans les eaux naturelles, les formes VBNC forment une part importante des communautés bactériennes. Les bactéries cultivables représentent, en effet, moins de 1% des bactéries totales et une proportion mal connue (mais probablement supérieure) des bactéries actives (Joux & Lebaron, 2000).

2.1.2.2 Facteurs entraînant l'entrée de *Lpn* dans un état VBNC

Les stratégies de *Lpn* pour s'adapter et résister à un environnement stressant ne se limitent pas aux interactions avec les amibes et au maintien dans les biofilms (chapitres 2.3.2 et 2.4), mais incluent également leur capacité à entrer dans un état VBNC et à se maintenir dans cet état pendant une période importante (Alleron, *et al.*, 2008).

Au sein des populations de *Lpn*, l'état VBNC est induit par différents types de conditions stressantes, telles qu'une carence nutritive, une température inadaptée, des eaux thermales dont la concentration en sel est trop élevée, ou l'application d'un traitement chloré : chlore libre, monochloramine (Hussong, *et al.*, 1987, Alleron, *et al.*, 2008).

L'état VBNC induit par le traitement d'un réseau (monochloramine ou traitement thermique par exemple) est responsable de la persistance à long-terme de *Lpn* dans ce réseau et peut expliquer sa recontamination plusieurs mois après la fin du traitement (Alleron, *et al.*, 2008, Allegra, *et al.*, 2011).

Les conditions rencontrées en rivières sont responsables d'une présence de *Lpn* sous sa forme VBNC principalement. La perte de cultivabilité peut alors être considérée comme une stratégie de survie dans l'environnement (Ohno, *et al.*, 2003).

La température est un facteur important dans l'induction de l'état VBNC chez *Lpn*. La perte de la cultivabilité est observée à différentes températures selon les souches et les milieux utilisés. En général, elle s'observe pour des températures inférieures à 25°C et pour des températures supérieures à 43.1°C. La perte du caractère cultivable s'intensifie au-dessus de 44.1°C, puis la forme cultivable de *Lpn* disparaît à partir de 44.5°C ou de 48.4°C selon l'étude considérée (Feeley, *et al.*, 1978, Pine, *et al.*, 1979, Kusnetsov, *et al.*, 1996, Konishi, *et al.*, 2006). Des formes cultivables ont tout de même pu être observées à une température inférieure à 20°C (Söderberg, *et al.*, 2004) montrant que *Lpn* incubée en microcosmes alimentés par de l'eau originaire de sources thermales, perd son caractère cultivable tout en maintenant son activité métabolique pour une température comprise entre 45 et 50°C (Ohno, *et al.*, 2003).

Dans le cas du traitement thermique d'un échantillon, ou d'un réseau, 2 heures à une température de 50°C sont nécessaires pour entraîner la perte de cultivabilité de *Lpn* dans le cas des sérogroupes 1 et 6. Le prétraitement thermique visant à limiter la présence de flore annexe lors de la méthode de dénombrement des formes cultivables de *Lpn* n'influence donc pas le résultat obtenu. Cette étape permet de limiter efficacement la croissance d'autres espèces, généralement associées à *Lpn*, telles que *Micrococcus sp* ou *Pseudomonas sp* (Dennis, *et al.*, 1984). La perte du caractère cultivable dépend donc du couple température/durée d'exposition. En effet, à une température de 54°C, 27 minutes suffisent à réduire d'un facteur 10 le nombre de colonies obtenues. Ce temps descend à 6 minutes pour une température de 58°C.

Un traitement thermique de 30 min à 70°C engendre une proportion de VBNC comprise entre 4.6 et 71.7%. De plus, pour un choc thermique à 70°C d'une durée comprise entre 0 et 60 min, la concentration des cellules mortes augmente proportionnellement à la durée d'exposition. Il a également été montré que certaines souches de *Legionella* soumises à une forte température de manière répétitive ou pendant une durée suffisante développent alors une résistance aux fortes températures (Allegra, *et al.*, 2008, Allegra, *et al.*, 2011).

L'effet de la température est souvent corrélé à un autre facteur. En effet, dans des conditions de carences nutritionnelles, le passage à l'état VBNC est plus rapide à une température de 37°C qu'à 4°C (Hussong, *et al.*, 1987).

Le passage à l'état VBNC dépend aussi du couple température/concentration de NaCl. Pour une température comprise entre 4 et 20°C, *Lpn* conserve sa cultivabilité jusqu'à une concentration maximale de NaCl de 3%. Cette capacité lui permet de survivre dans des conditions de salinité équivalentes à celles de l'eau de mer. Par ailleurs, un faible ajout de NaCl (de 0.1 à 0.5%) augmente la concentration en *Lpn* cultivables, ce phénomène est le plus marqué à des températures de 30 à 37°C. Une concentration en sel comprise entre 1% et 2% n'a pas d'effet toxique, mais sa combinaison avec de fortes températures (30 et 37°C) diminue la cultivabilité de *Lpn*. Lors d'une baisse de température, la baisse du métabolisme permettrait au sel de causer moins de dommages sur les cellules, augmentant alors la résistance de la cellule face au stress osmotique (Heller, *et al.*, 1998). Le facteur température est toutefois plus important que le facteur concentration en sel dans le maintien de *Lpn* sous sa forme cultivable, comme cela est également le cas chez *E. coli* (Heller, *et al.*, 1998).

Un pH non adapté est également responsable d'une perte de cultivabilité de *Lpn* dans les eaux thermales. Le pH optimal de *Lpn* dans ce milieu est de 8. A l'inverse, un pH inférieur à 2 est létal tandis qu'un pH compris entre 2 et 5 ou supérieur à 10 entraîne la perte du caractère cultivable de *Lpn* (Ohno, *et al.*, 2003).

2.1.2.3 Mécanismes de ressuscitation chez *Lpn*

Chez *Lpn*, le retour à une forme cultivable a tout d'abord été mis en évidence en laboratoire sur des œufs fécondés. L'injection, à des embryons des poulets (sac vitellin), d'échantillons d'eau dans lesquels *Lpn* avait perdu son caractère cultivable, se traduit par une importante mortalité des embryons parallèlement à un retour des formes cultivables de *Lpn* (Hussong, *et al.*, 1987).

Il est maintenant reconnu qu'une multiplication intra-cellulaire dans les amibes permet également à *Lpn* de retrouver sa forme cultivable. Ce phénomène a été observé initialement avec *Acanthamoeba castellanii*, mais de nombreuses espèces d'amibes permettent la multiplication intra-cellulaire de *Lpn* (chapitre 2.3.2) (Steinert, *et al.*, 1997).

2.1.2.4 Techniques de dénombrement des formes VBNC

Le terme d'ANC (Actives mais non cultivables) semble plus précis que le terme de VBNC, car la plupart des méthodes de détection de ces formes sont basées sur une activité cellulaire, qui n'est pas directement reliée à la capacité de reproduction des cellules (Barer & Harwood, 1999).

L'utilisation de sondes physiologiques ne peut s'adresser directement aux cellules en division, mais cible soit certaines activités métaboliques, soit l'intégrité des structures de la cellule (Figure 2). Les cellules dans lesquelles une activité métabolique est détectée, quelle que soit sa nature, peuvent être considérées comme actives. Si aucune activité métabolique n'est détectable, mais que l'enveloppe est intègre, elles sont dites inactives. Dans les cas intermédiaires, certaines cellules dont les membranes sont intactes ne sont pas suffisamment actives pour pouvoir être détectées. D'une manière générale, les cellules dont la membrane est endommagée sont considérées comme mortes (Joux & Lebaron, 2000).

La méthode du DVC (Direct Viable Count) comprend une étape d'incubation d'un échantillon d'eau enrichi par une source de carbone assimilable, en présence d'acide nalidixique. L'acide nalidixique est un antibiotique inhibant l'ADN gyrase chez de nombreuses bactéries Gram-. Les cellules touchées s'allongent car elles poursuivent leur croissance mais sans division du corps cellulaire. L'incubation est suivie par un marquage et un dénombrement en microscopie des cellules allongées (Kogure, *et al.*, 1979). Cette technique doit être adaptée à chaque écosystème car les concentrations d'antibiotiques dépendent des souches bactériennes (Joux & LeBaron, 1997). Elle n'est pas adaptée au cas de *Lpn*, en raison de sa capacité naturelle à prendre une forme filamenteuse dans les cultures en milieu liquide (Hussong, *et al.*, 1987, Steinert, *et al.*, 1997).

L'ATP (Adénosine TriPhosphate) est une molécule produite par les cellules viables, qui disparaît rapidement dans les cellules mortes et moribondes mais qui reste en concentration importante dans les cellules VBNC (Oliver, 2005). Cette molécule peut être dosée et constitue alors un marqueur de viabilité potentiel. Son dosage s'effectue grâce à une réaction enzymatique de bioluminescence. En présence d'ATP, d'ADP ou d'AMP, la luciférase transforme la luciférine, toutes deux ajoutées successivement à l'échantillon, en un composé bioluminescent. L'émission lumineuse est fonction de la teneur en ATP (ADP ou AMP) et donc de la concentration en micro-organismes vivants. Elle est mesurée à l'aide d'un luminomètre et exprimée en RLU ou Relative Light Unit (Jarraud & Freney, 2011).

Les marquages fluorescents permettent de tester différentes fonctions physiologiques ou certaines structures cellulaires (Figure 2). Dans un second temps, les cellules ainsi colorées sont dénombrées sous microscope à épifluorescence avec les filtres appropriés.

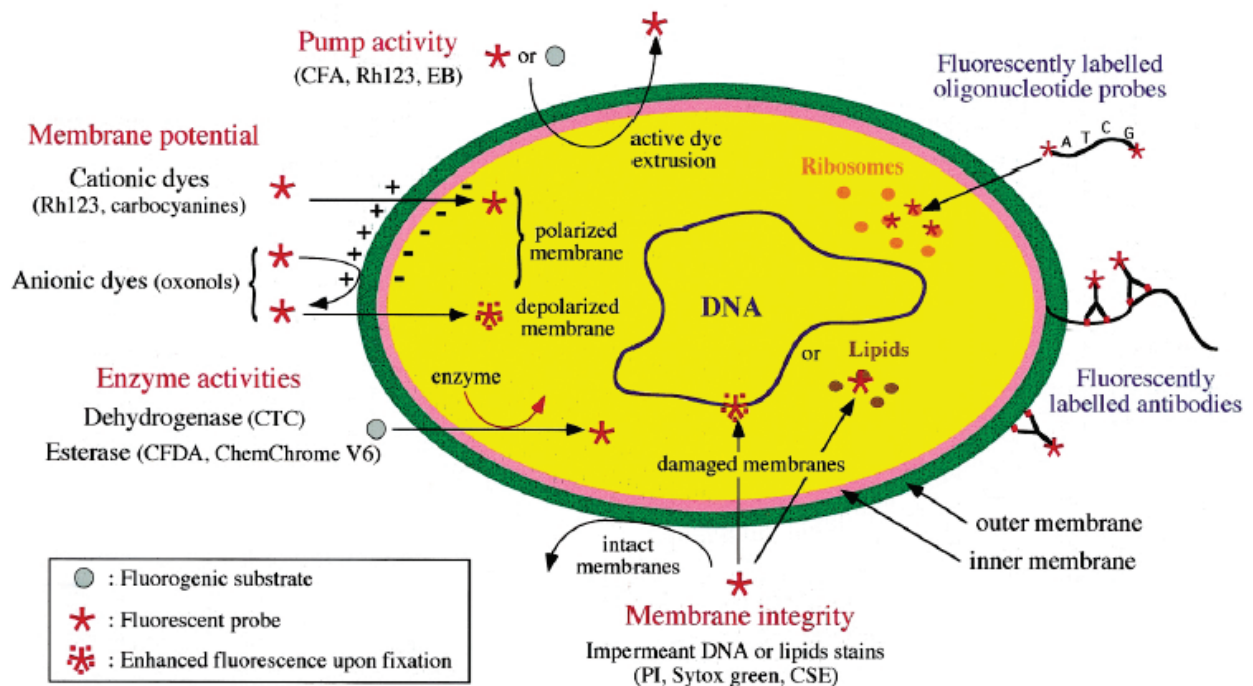
Physiological probes**Taxonomic probes**

Figure 2 : Sites cellulaires pouvant être ciblés par les sondes fluorescentes physiologiques ou taxonomiques (Joux & Lebaron, 2000)

Les premières sondes présentées ici sont basées sur le potentiel membranaire de la cellule. Ce potentiel est créé par l'activité métabolique de la cellule (lors de la respiration ou de l'hydrolyse de l'ATP par exemple). Des colorants sensibles au voltage peuvent être utilisés. Selon la charge du colorant, il s'accumule dans les cellules polarisées (colorants cationiques) ou dépolarisées (colorants anioniques). Dans des conditions appropriées, la quantité de colorant peut être directement reliée au niveau énergétique du métabolisme cellulaire (Joux & Lebaron, 2000). Le colorant le plus utilisé est un colorant cationique, la rhodamine 123. L'échantillon doit subir un prétraitement avant la coloration, généralement par un ajout d'EDTA, mais qui varie selon l'environnement et l'espèce bactérienne. Pour cette raison, ce colorant est peu utilisé à l'échelle de la communauté bactérienne. L'utilisation d'une carbocyanine (DiOC₆; 3,3'-dihexyloxacarbocyanine) permet d'éviter le prétraitement, mais elle se lie non spécifiquement aux régions hydrophobes de la cellule. Elle est alors à l'origine d'un "quenching" de la fluorescence (Joux & Lebaron, 2000).

Parmi les méthodes basées sur l'activité enzymatique, certaines ciblent l'activité estérasiqque des cellules. Les estérases sont présentes dans tous les organismes vivants. Elles transforment un substrat non fluorescent soluble dans l'eau en un produit fluorescent (fluorescéine ou un dérivé) polaire, retenu dans les cellules dont la membrane est intacte. Les principaux substrats utilisés sont le FDA (fluorescéine diacétate), le CFDA (carboxyfluorescéine diacétate) ou le ChemChrome B (Chemunex). Ces cellules estérase-actives ont toutes une membrane intacte, car chez les cellules mortes ou mourantes, lorsque la membrane est endommagée, la perte de la coloration s'effectue rapidement, même si la cellule présente encore des traces d'activité estérasiqque. Le ChemChrome B marque une plus grande diversité d'espèces Gram+ et Gram- que le FDA et le CFDA. Il peut donc être utilisé avec un plus grand nombre d'espèces bactériennes et il est plus efficace sur des échantillons environnementaux (Joux & Lebaron, 2000, Lew, *et al.*, 2010).

L'activité respiratoire peut également être mesurée à l'aide de sels de tétrazolum. Le CTC (5-cyano-2,3-ditolyl tetrazolium chloride) est un composant non coloré, auquel la membrane plasmique est perméable, qui produit un précipité fluorescent rouge (formazan) dans la cellule lorsqu'il est réduit par le système de transport des électrons et/ou par différentes déshydrogénases de la cellule. Le CTC est, en effet, un accepteur artificiel d'électrons. Dans les cellules qui respirent, le système de transport des électrons est directement lié au métabolisme énergétique de la cellule. La capacité des cellules à réduire un sel de tétrazolum peut donc être considérée comme un indicateur de l'activité bactérienne. Le CTC est utilisé en écologie microbienne, à la fois dans les systèmes aquatiques et terrestres (Rodriguez, *et al.*, 1992, Joux & Lebaron, 2000, Créach, *et al.*, 2003, Lew, *et al.*, 2010). Il existe tout de même certaines controverses à ce marquage, au sujet notamment d'un effet toxique du CTC sur le métabolisme bactérien à partir d'une certaine concentration (Ullrich, *et al.*, 1996). L'INT (Iodonitrotetrazolium), un autre sel de tétrazolum, peut également être utilisé mais il est plus difficilement réduit dans les bactéries que le CTC (Créach, *et al.*, 2003). Le marquage par le CTC est mieux détecté et plus sensible que celui effectué avec l'INT, le CTC-formazan est aussi plus stable que l'INT-formazan (Rodriguez, *et al.*, 1992).

Certains colorants peuvent être activement expulsés des cellules actives à travers l'activité des pompes cellulaires. C'est le cas de la rhodamine 123, de la carboxyfluoroscéine et du bromure d'éthidium, par exemple. Ce phénomène peut donc biaiser les résultats lors de l'utilisation de ces composés en tant que sondes. Cette activité d'exportation de composés peut être mesurée précisément à l'aide de bromure d'éthidium. Cette méthode n'est applicable qu'à quelques espèces en culture. Elle n'est pas assez universelle pour être appliquée à des échantillons environnementaux (Joux & Lebaron, 2000).

La détermination des bactéries actives peut également se baser sur les bactéries présentant une membrane cytoplasmique intacte et fonctionnelle. Il est reconnu que les bactéries sont potentiellement actives si leur membrane cellulaire est intacte, tandis qu'elles sont potentiellement mortes si leur membrane est endommagée. En effet, la perte de l'intégrité membranaire cause des dommages significatifs pour la cellule en relation avec de multiples fonctions liées à la membrane plasmique (barrière perméable, transport, activité respiratoire...). La perte de l'intégrité membranaire est généralement considérée comme irréversible. L'analyse de l'intégrité membranaire est basée sur la capacité d'entrée de différents composés chimiques (composés fluorescents) qui, même à faible concentration, ne traversent pas les membranes cellulaires intactes et fonctionnelles (Joux & Lebaron, 2000, Lew, *et al.*, 2010). Deux fluorochromes sont utilisés classiquement : le SYTO9 et l'iodure de propidium (IP). Ils diffèrent à la fois dans leurs caractéristiques spectrales et leur capacité à pénétrer dans les cellules bactériennes (Howard-Jones, *et al.*, 2001). Le SYTO9 est un marqueur des acides nucléiques (ADN et ARN) qui pénètre et s'accumule dans les bactéries vivantes dont les membranes sont intactes. Il fluoresce en vert lorsqu'il est excité par des longueurs d'ondes situées dans le bleu. L'IP, de plus grande taille, pénètre seulement dans les cellules mortes dont la membrane est endommagée, les colorant alors en rouge (Joux & Lebaron, 2000, Lew, *et al.*, 2010). Comme cela a été décrit au cours d'un chapitre précédent (Chapitre 2.1.2.1), ce marquage peut être couplé à la technique de cytométrie en flux, ceci a été testé sur *Lpn* au cours des études effectuées par Allegra *et al.* (2008, 2011).

Un marquage FISH (Fluorescent In Situ Hybridization) s'effectue à l'aide d'une sonde oligonucléotidique spécifique marquée grâce à un fluorochrome. Les sondes ciblent généralement des ARNr. Les ARNr sont présents dans toutes les cellules vivantes avec un nombre de copies relativement important (Joux & Lebaron, 2000, Zwirgmaier, 2005, Lew, *et al.*, 2010).

Le fluorochrome utilisé peut avoir un effet sur la performance du marquage. Les cyanines (Cy) permettent, en effet, un marquage plus fort et sont plus stables vis-à-vis du phénomène de "photobleaching", nom donné à l'extinction de la fluorescence lors de l'excitation de l'échantillon marqué (Bouvier & Del Giorgio, 2003). Différents facteurs environnementaux peuvent également influencer la performance de ce marquage : type d'écosystème vis-à-vis de la ressource nutritive principale, groupe phylogénétique dominant, état physiologique des cellules, type de communauté (bactérioplancton/biofilm) (Bouvier & Del Giorgio, 2003).

Compte tenu du fait que le contenu en ARNr de nombreuses espèces bactériennes varie en fonction de leur taux de croissance, et qu'il diminue rapidement dans les cellules inactives, cette méthode a été proposée par certains auteurs pour estimer l'état physiologique des cellules. Seules les cellules viables et fortement actives, c'est-à-dire qui possèdent un nombre suffisant de ribosomes non-endommagés, sont marquées par cette technique (Christensen, *et al.*, 1999, Lew, *et al.*, 2010). Tandis que pour d'autres, le contenu en ARNr est un mauvais indicateur de l'activité en raison d'une trop grande stabilité des ARNr (Joux & Lebaron, 2000). La corrélation entre le contenu en ARNr et le taux de croissance ne serait valable que pour les bactéries à croissance rapide mais pas pour les organismes à croissance lente ou en état de carence (Christensen, *et al.*, 1999). La présence d'ARNr n'est alors pas directement une preuve de l'activité métabolique, mais indique au moins que la cellule est potentiellement active (Créach, *et al.*, 2003). Les sondes ARNr restent toutefois des sondes spécifiques à une espèce, un genre ou un groupe bactérien, elles sont donc qualifiées de sondes taxonomiques (Joux & Lebaron, 2000).

Chaque méthode présente des avantages et des inconvénients (Tableau 1). Seules quelques sondes (réduction des sels de formazan, activité estérasique, sondes ANRr) ont pu être appliquées à des communautés naturelles dans le but de décrire l'hétérogénéité physiologique des cellules (Lew, *et al.*, 2010).

Tableau 1 : Avantages et désavantages des différentes techniques basées sur la fluorescence pour la détermination de l'état physiologique des cellules dans des études environnementales (Lew, *et al.*, 2010)

Technique	Advantages	Limitations
Esterase activity (<i>cf.</i> 2.1)	<ul style="list-style-type: none"> fast and simple technique (Joux and Lebaron 2000) useful in studies on different types of environment (Joux and Lebaron 2000) method allows the detection of active cells and/or those with intact membranes (Monoro <i>et al.</i> 2004) 	<ul style="list-style-type: none"> cells with a very low esterase activity can be identified as dead ones (Joux and Lebaron 2000) the selected dyes are not applicable to recognition of activity of Gram-negative bacteria (Morono <i>et al.</i> 2004)
Dehydrogenase activity (<i>cf.</i> 2.2)	<ul style="list-style-type: none"> fast and simple technique (Rodriguez <i>et al.</i> 1992) useful in studies on different types of environment (Whiteley <i>et al.</i> 2003; Junge <i>et al.</i> 2004; Freese <i>et al.</i> 2006; Pesce <i>et al.</i> 2008) bacteria under aerobic and anaerobic conditions are identifiable (Smith and McFeters 1997) the criterion characterizes not only respiratory active bacteria but also actively growing cells (Sherr <i>et al.</i> 1999; Georgio <i>et al.</i> 1996) 	<ul style="list-style-type: none"> false results if non-specific reduction of CTC to CTF by intracellular enzymes occurs (Sherr <i>et al.</i> 2001) formazan (CTF) is unstable and fades quickly, which requires using sensitive cameras for microscopic examination (Sherr <i>et al.</i> 2001) the method detects only dehydrogenase highly active bacteria; bacteria with low dehydrogenase activity can be identified as CTC (Sherr <i>et al.</i> 1999)
Cellular membrane activity – live/dead (<i>cf.</i> 3)	<ul style="list-style-type: none"> very fast and simple technique (Berman <i>et al.</i> 2001) the technique visualizes all cells, and is not limited to specific groups of bacteria (Howard-Jones <i>et al.</i> 2001) by using two dyes, it reveals simultaneously live and dead cells (Choi <i>et al.</i> 1996) method is suitable for studies in different types of environment (Choi <i>et al.</i> 1996; Hauglund <i>et al.</i> 2003; Coa-Hoang <i>et al.</i> 2008; Ferrari and Gillings 2009) 	<ul style="list-style-type: none"> the technique does not identify dead cells if they have lost their cytoplasmic content (Lawrence <i>et al.</i> 1997) it is useful for determination of only one cellular criterion (Howard-Jones <i>et al.</i> 2001) staining in this technique is dependent on the concentration of a salt (Hauglund 1996)
Metabolic activity of cells with an integrated nucleoid – NuCC (<i>cf.</i> 4)	<ul style="list-style-type: none"> fast and simple technique (Zweifel and Hagström 1995) provides an information about all and about active bacteria irrespective of the type of cells (Howard-Jones <i>et al.</i> 2001) the results obtained with this technique are more important for determination of the dynamics of a microbial assemblage than DAPI dyed cells (Choi <i>et al.</i> 1999; Berman 2001; Berman <i>et al.</i> 2001; Lew 2003) 	<ul style="list-style-type: none"> the technique distinguish live/active cells from dead cells, but does not differentiate activity within live cells, <i>e.g.</i>, it does not enable researchers to detect bacteria characterized by low cellular activity (Howard-Jones <i>et al.</i> 2001) the method is suitable for determination of only one criterion (Howard-Jones <i>et al.</i> 2001)
Activity of cells containing intact structures of ribosomes – FISH (<i>cf.</i> 5)	<ul style="list-style-type: none"> the technique involves two independent measurements: content and quality of ribosomes in a cell; it identifies cells which actively incorporate specific substrates (Lee <i>et al.</i> 1999; Bouvier and del Giorgio 2003; Gruden <i>et al.</i> 2003) the technique promotes an identification of phylogenetically large groups as well as specific species (Bottari <i>et al.</i> 2006) the method and its modifications are suitable for research on various types of environment (Perthaler <i>et al.</i> 2001; Barra Caracciolo <i>et al.</i> 2005a,b; Bertaux <i>et al.</i> 2007; Bertoni <i>et al.</i> 2008; Pesce <i>et al.</i> 2008; Posch <i>et al.</i> 2009) 	<ul style="list-style-type: none"> the low detection level in the standard FISH technique when applied to slowly multiplying or very small organisms (Zwirgmaier 2005) problems caused by very high level of autofluorescence of the background when green excitation is used (Perthaler <i>et al.</i> 2001) the need to use various modifications in order to obtain reliable results of assays (Perthaler <i>et al.</i> 2002; Zwirgmaier 2004, 2005; Bottari <i>et al.</i> 2006; Rogers <i>et al.</i> 2007)

La liste de méthodes décrites ci-dessus est bien sûr non-exhaustive. Les VBNC sont ensuite estimées comme la différence entre les bactéries actives ou viables et les bactéries cultivables. Toutefois, ces techniques ne sont généralement pas spécifiques à une espèce bactérienne. Lorsque l'on s'intéresse à une espèce spécifique au sein d'une communauté bactérienne, il est nécessaire de coupler ces techniques à un marquage spécifique. Mais les doubles marquages posent toutefois de nombreux problèmes : incompatibilité entre le premier marquage et un réactif du second ; superposition des spectres d'absorption/d'émissions des différentes sondes. La combinaison entre une sonde taxonomique (sondes ARNr ou anticorps fluorescents) et une sonde physiologique reste un challenge dans le but de déterminer spécifiquement le nombre de cellules en fonction de leur état physiologique (Joux & Lebaron, 2000).

De la même manière certains doubles marquages peuvent combiner des sondes ciblant différentes activités physiologiques. Il s'agit généralement de marquages complexes en raison du phénomène de "quenching" (baisse du signal de fluorescence) lié aux interactions entre différents fluorophores. De plus, l'instrumentation disponible pour l'analyse de la fluorescence peut limiter les doubles marquages possibles (Joux & Lebaron, 2000).

2.2 *Lpn* dans l'environnement, facteurs de contrôle

2.2.1 Présence de *Lpn* dans l'environnement

Les enquêtes menées à la suite de cas de légionellose, montrent que la bactérie provient le plus souvent d'environnements aquatiques naturels ou artificiels (Orrison, *et al.*, 1981). A l'inverse, la présence de *Lpn* dans un échantillon d'eau n'engendre pas obligatoirement de cas de légionellose. Il est apparu en effet, dès les premières investigations menées à ce sujet, que *Lpn* était présente dans 90% des échantillons d'eau douce analysés (Fliermans, *et al.*, 1979).

Lpn est maintenant reconnue comme une bactérie ubiquiste des eaux douces, rivières et lacs, dans des habitats d'origine naturelle ou anthropique. Cette espèce est néanmoins loin de dominer les populations bactériennes. Elle représente, en effet, moins de 1 % de la population bactérienne de la plupart des échantillons d'eau (Fliermans, *et al.*, 1981, Steinert, *et al.*, 2002, Brooks, *et al.*, 2004, Devos, *et al.*, 2005).

Les caractéristiques des milieux aquatiques dans lesquels *Lpn* est rencontré et qui, semble-t-il, lui permettent parfois de se multiplier, sont très diverses : une température comprise entre 0 et 68°C malgré une préférence pour des températures comprises entre 40 et 60° C (Fliermans, *et al.*, 1981, Dennis, *et al.*, 1984, Diederer, 2008), un pH compris entre 5 et 9.2, un taux de CO₂ variant entre 0.3 et 9.6 ppm, une conductivité allant de 18 à 106 µS/cm, une profondeur de lecture du disque de Secchi comprise entre 1 et 4 m, une concentration en chlorophylle a comprise entre 0.7 et 24 mg.m⁻³ et en phéophytine comprise entre 0.2 et 18.8 mg.m⁻³ (Fliermans, *et al.*, 1981, Wadowsky, *et al.*, 1985, Diederer, 2008).

Bien que *Lpn* ne soit pas capable de se multiplier en conditions anaérobies, une survie prolongée a tout de même lieu en absence d'oxygène (Wadowsky, *et al.*, 1985). Les environnements chauds colonisés par des algues ou recevant des produits algaux sont également des environnements favorables à son développement (Tison, *et al.*, 1980, Fliermans, *et al.*, 1981).

Même si une concentration en NaCl de 3.5% inhibe la forme cultivable de *Lpn* dans l'environnement, elle peut survivre sous son état VBNC dans un milieu présentant des concentrations en sel équivalentes à l'eau de mer. Leur présence dans cet environnement n'est donc pas exclue (Heller, *et al.*, 1998, Ohno, *et al.*, 2003, Tsuchiya, *et al.*, 2005).

Les caractéristiques physico-chimiques des eaux hydrothermales permettent le développement de *Lpn* (Bornstein, *et al.*, 1989, Molmeret, *et al.*, 2001). On retrouve cette bactérie lorsque la température des eaux thermales est comprise entre 22.7 et 48.6°C, dans une gamme de pH comprise entre 5 et 8, donc inférieure à celle des eaux de surface (Ohno, *et al.*, 2003, Huang, *et al.*, 2010).

Dans leur étude sur les eaux thermales aixoises, Molmeret, *et al.*, (2001) ont montré que le séro groupe prédominant des *Lpn* dans ce milieu est le séro groupe 3 et ont suggéré que cet antigène pouvait être plus adapté à l'environnement aquatique que celui du séro groupe 1.

La contamination des sources souterraines peu profondes par *Lpn* ou d'autres espèces du même genre s'effectue le plus souvent lors de la percolation des eaux de surface. Cette contamination ne s'étend tout de même pas jusqu'aux sources les plus profondes (Brooks, *et al.*, 2004), probablement du fait du gradient thermique.

2.2.2 Facteurs de contrôle

Comme cela a été évoqué précédemment, la température est un facteur important dans le développement de *Lpn* dans l'environnement. En dehors de l'optimum, elle entraîne généralement un passage de *Lpn* sous sa forme VBNC. Il a également été montré qu'elle joue un rôle important sur la composition cellulaire de *Lpn* : modification de la composition des acides gras, modification de la concentration en granules lipidiques (chapitre 2.1.1.1). Les températures basses (24°C par exemple) augmentent la concentration en PHB (polyhydroxybutyrate). Le PHB correspond à une source essentielle de carbone et d'énergie pour la cellule, il est impliqué dans la survie dans des environnements pauvres (Mauchline, *et al.*, 1992). De plus, un système de sécrétion de type II, le système *Isq*, semble important dans les mécanismes de résistance au froid chez *Lpn* (Söderberg, *et al.*, 2004, Söderberg, *et al.*, 2008). Ce système est présenté plus en détail dans la suite de cette synthèse (chapitre 2.3.2.2).

La sensibilité à la lumière est également un facteur à prendre en compte pour comprendre la distribution de *Lpn*. La forme cultivable en suspension dans de l'eau de lac est plus sensible aux UV et à la lumière visible que la plupart des autres bactéries hétérotrophes d'eau douce, à l'exception d'*E. coli*, *S. faecalis* et *P. aeruginosa*. Selon Dutcka (1984), l'association de la lumière avec une eau salée est plus stressante sur la forme cultivable mais *Lpn* reste tout de même plus résistante à cette association de facteurs que la plupart des bactéries marines.

L'importance des ions métalliques sur le développement de *Lpn* a été principalement étudiée dans le cas des réseaux d'eau, où la colonisation de *Lpn* semble limitée, comme d'autres bactéries, par les fortes concentrations en cuivre, une dureté importante, un fort pouvoir oxydant et une forte concentration en chlore libre. Des concentrations en aluminium, cadmium, plomb, manganèse et zinc comprises entre 10 et 100 µg/L inhibent *Lpn*. Concernant les ions fer et cuivre, l'inhibition est observée pour des concentrations comprises entre 10 et respectivement 20 et 50 µg/L. A l'inverse, un effet opposé de stimulation de la forme cultivable de *Lpn* a été observé pour de fortes concentrations les ions fer, zinc et potassium (de 100 µg/L à 1 mg/L pour le fer et le zinc et entre 1 et 100 mg/L pour le potassium). Dans ces réseaux, seules les concentrations en fer, chlorures et chromes ont pu être trouvées en corrélation, de façon plus ou moins importante, avec la concentration en *Lpn* cultivables de l'eau. Mais les concentrations en fer, chlorures et chrome ne sont pas pour autant un indicateur de la présence de *Lpn*. A l'inverse, sur une gamme de concentration toujours comprise entre 10 et 100 µg/L, les ions calcium, magnésium et potassium n'ont aucun effet sur la concentration en *Lpn* (States, *et al.*, 1985, Borella, *et al.*, 2004).

Le type de milieu étudié, joue un rôle important dans la détermination des facteurs de régulation de *Lpn*. Ainsi, dans les eaux souterraines, aucune corrélation entre la présence de légionelles et des paramètres physico-chimiques (température, pH, conductivité, turbidité et concentration en O₂ dissous) ou biologiques n'a pu être mise en évidence (Brooks, *et al.*, 2004).

2.3 Relation entre *Lpn* et les autres organismes

L'occurrence de *Lpn* dans les environnements aquatiques ne s'explique pas uniquement par les conditions physico-chimiques de ces milieux. Les relations avec les autres espèces bactériennes de la communauté sont également importantes, avec l'existence d'une inhibition par différentes espèces. Dans l'environnement, la présence de *Lpn* est fréquemment favorisée par la présence de protistes qui peuvent passer d'un rôle de prédateur de *Lpn* à un rôle d'hôte dans lequel *Lpn* se réplique activement et se protège des différents stress (Atlas, 1999).

2.3.1 Relations entre *Lpn* et les autres espèces bactériennes

Plusieurs jours sont nécessaires à l'apparition des premières colonies de *Lpn* sur les milieux de culture utilisés pour leur dénombrement. Lorsque l'échantillon analysé provient du milieu naturel plusieurs autres facteurs viennent participer à la gêne du développement des colonies :

- chute accélérée de la concentration en nutriments du milieu de culture du fait des espèces à croissance plus rapide,
- occupation de la surface du milieu de culture du fait du développement de la flore annexe
- présence d'espèces potentiellement inhibitrices de *Lpn*.

Pour toutes ces raisons, l'absence de colonies lors d'un dénombrement par culture n'est donc pas obligatoirement synonyme de l'absence réelle de *Lpn* cultivables dans l'échantillon.

Dans l'environnement, l'influence des autres espèces bactériennes sur *Lpn* peut s'effectuer à travers une modification de son adhérence et, sans doute en conséquence, de sa persistance dans les biofilms (Guerrieri, *et al.*, 2008).

L'effet inhibiteur d'une espèce bactérienne sur une autre s'effectue généralement à travers la synthèse et la libération de molécules inhibitrices. C'est le cas des bactériocines, protéines à activité antibactérienne, produites par certaines espèces bactériennes envers d'autres espèces. Ainsi, *Staphylococcus warnerii* produit une bactériocine inhibant plusieurs espèces bactériennes appartenant uniquement au genre *Legionella*. Cette molécule est la première qui met en évidence une activité anti-*Lpn* (Héchar, *et al.*, 2005).

Comme *S. warnerii*, un grand nombre de bactéries aquatiques produisent des bactériocines ou des substances leur ressemblant : les BLS (Bacteriocin-like substances). Guerrieri *et al.* ont montré que *Lpn* est l'espèce bactérienne la plus sensible aux BLS par référence à 80 autres espèces bactériennes aquatiques. Ils n'observent pas de différences entre les différents sérogroupes de *Lpn* et montrent qu'aucune des souches de *Lpn* testées (appartenant aux sérogroupes 1, 3, 4, 6, 7 et 14), n'est capable de produire de telles substances (Guerrieri, *et al.*, 2008).

Ainsi, une souche de *Pseudomonas fluorescens* est capable d'inhiber la formation de biofilms à *Lpn* mais aussi de diminuer leur stabilité grâce à la production d'une plus forte quantité de BLS (Guerrieri, *et al.*, 2008).

Les espèces appartenant au genre *Aeromonas* inhibent plusieurs espèces appartenant au genre *Legionella* (Toze, *et al.*, 1994). Le composé impliqué dans le processus d'inhibition serait un métabolite secondaire, c'est-à-dire une molécule produite puis sécrétée uniquement lorsque la bactérie est en phase stationnaire. Lors d'une culture, la production tardive de ce métabolite protège les espèces bactériennes à croissance rapide de son influence ce qui n'est pas le cas de *Lpn* dont la croissance est lente. Ceci est amplifié par une forte spécificité de l'activité de ce composé vis-à-vis des légionelles (Toze, *et al.*, 1994).

Les relations entre *Lpn* et *P. aeruginosa* sont assez complexes et dépendent des conditions environnementales. Lorsque ces deux espèces se retrouvent dans une même vacuole de réplication (au cours du processus de réplication intra-amibienne), *P. aeruginosa* a une influence négative sur *Lpn*. Cet effet s'explique à travers la consommation, par *P. aeruginosa*, des ressources fournies par l'amibe également nécessaires à la réplication de *Lpn*. Une production de BLS peut également être impliquée, même si, en milieu de culture, les BLS produites par *P. aeruginosa* n'ont aucun effet sur la croissance de *Lpn*. Les BLS produites par *P. aeruginosa* ont tout de même un effet synergique avec les BLS sécrétées par *P. fluorescens* qui présentent un effet inhibiteur sur le développement de *Lpn* (Declerck, *et al.*, 2005, Guerrieri, *et al.*, 2008).

Dans les réseaux domestiques, les deux bactéries (*Lpn* et *Pseudomonas*) sont rarement présentes simultanément ce qui pourrait s'expliquer par des sensibilités différentes aux caractéristiques physiques et chimiques des réseaux (Borella, *et al.*, 2004).

Pseudomonas semble ainsi être plus influencé par les caractéristiques de l'eau que par les spécificités physiques des réseaux. Ce genre est inhibé notamment par le chlore libre et la température d'utilisation de l'eau. Il est favorisé par une dureté importante et une très forte concentration en calcium (Borella, *et al.*, 2004).

A l'inverse, les caractéristiques du système sont très importantes pour le développement de *Lpn*. Le nombre d'étages et d'appartements des immeubles, les dispositifs anciens de production collective d'eau chaude sanitaire (pour lesquels notamment les distances entre le chauffe-eau et les points d'usage sont importantes) sont autant d'éléments qui augmentent le risque de contamination par *Lpn*. Dans ces conditions, la bactérie semble peu affectée par le type de canalisation, par la température de l'eau et par la concentration en chlore (Borella, *et al.*, 2004).

Il a également été montré que l'auto-inducteur impliqué dans l'un des systèmes de quorum sensing de *P. aeruginosa* (chapitre 2.4.2.2), la N-(3-oxododecanoyl)-L-homosérine lactone exerce une activité bactériostatique et empêche ainsi la formation de biofilm chez différentes espèces du genre *Legionella* dont *Lpn*. L'expression des gènes du *quorum sensing* de *Lpn* serait stimulée par le signal provenant de *P. aeruginosa* (Kimura, *et al.*, 2009). *Lpn* passerait alors de sa forme répliquative à sa forme transmissive lorsque la concentration en *P. aeruginosa* dépasse un certain seuil (chapitre 2.1.1.4).

Contrairement aux espèces précédentes qui inhibent le développement de *Lpn*, *Acinetobacter lowfi* est l'une des espèces incapables de produire des substances de type bactériocine mais dont la présence semble avoir même tendance à stimuler le développement de *Lpn* dans les biofilms (Guerrieri, *et al.*, 2008).

2.3.2 Lpn et les protistes

Les protistes jouent un rôle important dans le maintien et la multiplication de *Lpn* dans les environnements aquatiques naturels, mais également au sein des réseaux d'eau potable. Ils représentent une niche favorable à la réplication de cette bactérie, et lui fournissent une protection contre les processus de traitement des eaux et contre les mauvaises conditions environnementales (Barbaree, *et al.*, 1986, Atlas, 1999).

Alors que dans de rares cas, *Lpn* est digérée par le protiste et représente alors un gain nutritionnel pour ce dernier; dans la plupart des cas, *Lpn* utilise son hôte pour se répliquer avant de le lyser (Atlas, 1999). Même si nous nous consacrons ici principalement au cas des protistes, de grandes similitudes existent entre le développement intra-cellulaire de *Lpn* dans les protistes et dans les macrophages lors du processus infectieux.

2.3.2.1 Protistes permettant le phénomène de multiplication intra-cellulaire de *Lpn*

La multiplication intra-cellulaire de *Lpn* a tout d'abord été observée dans les amibes. Une quinzaine d'espèces de protistes (amibes, ciliées et flagellés ; Tableau 2) sont actuellement reconnus comme permettant cette multiplication (Fields, *et al.*, 2002, Declerck, *et al.*, 2005). Chez les amibes, c'est le cas d'espèces très connues comme : *Acanthamoeba castellanii*, *Hartmannella vermiformis*, *Dictyostelium discoideum*, *Vahlkampfia* spp, *Naegleria* spp, *Willaertia magna*, *Naegleria fowleri*, (Rowbotham, 1980, Holden, *et al.*, 1984, Newsome, *et al.*, 1985, Hägele, *et al.*, 2000, Declerck, *et al.*, 2005, Shadrach, *et al.*, 2005, Steinert & Heuner, 2005, Piao, *et al.*, 2006, Dey, *et al.*, 2009) ; mais également d'espèces moins connues telles que *Balamuthia mandrillaris* (Shadrach, *et al.*, 2005).

Tableau 2 : Principales espèces de protistes permettant la multiplication intracellulaire de *Lpn* (Lau & Ashbolt, 2009)

Type	References
Amoeba	
<i>Acanthamoeba castellanii</i>	Rowbotham (1980)
<i>Acanthamoeba culbertsoni</i>	Fields <i>et al.</i> (1989)
<i>Acanthamoeba hatchetti</i>	Breiman <i>et al.</i> (1990b)
<i>Acanthamoeba polyphaga</i>	Rowbotham (1980, 1986)
<i>Acanthamoeba palestinensis</i>	Rowbotham (1986)
<i>Acanthamoeba royreba</i>	Tyndall and Domingue (1982)
<i>Amoeba proteus</i> strain x D	Park <i>et al.</i> (2004)
<i>Comandonia operculata</i>	Breiman <i>et al.</i> (1990b)
<i>Echinamoeba exudans</i>	Fields <i>et al.</i> (1989)
<i>Filamoeba nolandii</i>	Breiman <i>et al.</i> (1990b)
<i>Hartmannella</i> spp.	Fields <i>et al.</i> (1989)
<i>Hartmannella cantabrigiensis</i>	Rowbotham (1986); Breiman <i>et al.</i> (1990b)
<i>Hartmannella vermiformis</i>	Rowbotham (1986); Fields <i>et al.</i> (1989); Breiman <i>et al.</i> (1990b)
<i>Naegleria fowleri</i>	Newsome <i>et al.</i> (1985)
<i>Naegleria gruberi</i>	Rowbotham (1980)
<i>Naegleria jadini</i>	Rowbotham (1980)
<i>Naegleria lovaniensis</i>	Tyndall and Domingue (1982)
<i>Paratetramitus jugosis</i>	Breiman <i>et al.</i> (1990b)
<i>Vahlkampfia</i> spp.	Breiman <i>et al.</i> (1990b)
<i>Vahlkampfia jugosa</i>	Rowbotham (1986)
<i>Vahlkampfia ustiana</i>	Breiman <i>et al.</i> (1990b)
Ciliate	
<i>Tetrahymena pyriformis</i>	Fields <i>et al.</i> (1984)
<i>Tetrahymena thermophila</i>	Kikuhara <i>et al.</i> (1994)
Slime Mould	
<i>Dictyostelium discoideum</i>	Hägele <i>et al.</i> (2000)

Alors que la plupart des espèces d'amibes impliquées dans les processus de multiplication intra-cellulaire colonisent des environnements aquatiques, *Dictyostelium discoïdeum* se développe dans des sols humides, facilitant ainsi la présence de *Lpn* dans cet environnement. Lors d'épisodes pluvieux, le phénomène de ruissellement de l'eau dans le sol jusqu'à un milieu aquatique peut alors favoriser la colonisation de ces derniers par *Lpn*. La multiplication intra-cellulaire de *Lpn* s'effectue de la même manière dans *D. discoïdeum* qu'à l'intérieur des autres espèces d'amibes (Hägele, *et al.*, 2000, Solomon & Isberg, 2000).

D'autres protistes permettent également la réplication intra-cellulaire de *Lpn*, c'est le cas des ciliés *Tetrahymena pyriformis* et *Cyellidium spp.* par exemple (Fields, *et al.*, 1984, Declerck, *et al.*, 2005).

Expérimentalement, en conditions nutritives limitées, la température du milieu influence les relations entre *Lpn* et *Acanthamoeba spp.* En effet, à température ambiante *Lpn* semble incapable d'effectuer le processus de réplication intra-cellulaire, tandis qu'à 37°C elle présente une croissance exponentielle grâce à ce processus (Moffat & Tompkins, 1992).

Les interactions hôtes-*Lpn* sont principalement basées sur des facteurs localisés à la surface de la bactérie ou sécrétés dans l'environnement extra-cellulaire, ce qui confère un rôle important aux différents systèmes de sécrétions de protéines (Lammertyn & Ann,, 2004). Les principaux systèmes de sécrétions utilisés par *Lpn* lors de la réplication intra-amibienne sont présentés dans les paragraphes suivants.

2.3.2.2 Les principaux systèmes de sécrétion de *Lpn*

Il existe différentes voies de transport des protéines à travers les enveloppes bactériennes dont certaines s'effectuent en une seule étape (système de type I, utilisation d'un transporteur, transporteur de type III, dépendant du contact) tandis que d'autres s'effectuent en deux étapes avec une étape périplasmique intermédiaire (type II, type IV, autotransporteurs) (Lammertyn & Ann,, 2004). Chez les bactéries Gram-, 6 à 8 types de systèmes de sécrétion sont connus (Cianciotto, 2009). Les systèmes de sécrétion I, II, III et IV restent les plus connus.

Un système de type I est composé de trois protéines formant un canal permettant le transport direct des protéines depuis le cytoplasme vers l'extérieur de la cellule (Liles, *et al.*, 1999, Cianciotto, 2009).

Dans un système de sécrétion de type II, les protéines sont transportées à travers la membrane interne par un mécanisme sec ou tat-dépendant, puis la protéine mature traverse la membrane externe grâce à l'action combinée de 14 protéines. Au total, le système de sécrétion de type II est constitué de plus de 25 protéines, dont plusieurs types d'enzymes de dégradation : des phospholipases, des protéases, une ribonucléase et une chitinase (Liles, *et al.*, 1999, Cianciotto, 2009).

Un système de sécrétion de type III met en jeu une vingtaine de protéines afin de transporter les exoprotéines depuis le cytoplasme directement à la surface de la cellule d'où elles peuvent alors être injectées à une cellule animale ou végétale uniquement par contact (Liles, *et al.*, 1999, Cianciotto, 2009).

Enfin, le système de sécrétion de type IV est un système de transport sec-dépendant de protéines à travers la membrane interne suivi d'un passage à travers la membrane externe (Liles, *et al.*, 1999, Cianciotto, 2009).

Lpn exprime clairement des systèmes de sécrétion de type II et IV, son génome suggère l'existence de système de type I et V. D'autres systèmes de sécrétions peuvent être spécifiques à certaines souches de *Lpn* (Lammertyn & Ann,, 2004, Cianciotto, 2009).

2.3.2.2.1 Système de sécrétion de type I

Le système de sécrétion de type I de *Lpn* est appelé *Legionella secretion system* (LSS), il est composé de 6 gènes : *lssXYZABD*. Les gènes *lssB* et *lssD* sont proches de ceux des systèmes de sécrétion de *V. cholerae* et d'*E. coli* respectivement. En général dans les systèmes de sécrétion de type I, les transporteurs ABC forment le pore permettant l'excrétion d'enzymes, de toxines ou d'autres facteurs de virulence. Dans ce cas, la protéine *LssY* possède plusieurs régions transmembranaires ainsi qu'un domaine de type PAP2 retrouvé dans différentes enzymes (phosphatases). *LssZ* et *LssA* sont deux petites protéines de 23 et 28 kDa respectivement. Le gène *lssB* contient une séquence correspondant au transporteur transmembranaire ABC ainsi qu'un domaine ATPase. La protéine *LssD* présente un peptide signal et une signature de la famille de protéines de sécrétion HlyD. Enfin, un autre gène, le gène *lssE* code pour une protéine de 96 kDa qui semble impliquée dans la transduction du signal. Ce système semble spécifique à *Lpn* mais son fonctionnement est mal connu (Jacobi & Heuner, 2003).

2.3.2.2.2 Système de sécrétion de type II

Le système de sécrétion de type II est un facteur clé dans l'écologie de *Lpn*. Ce système de sécrétion intervient à la fois dans les processus de virulence et au cours de la capture des nutriments (lors d'une croissance à faible température ou de la multiplication intra-cellulaire dans les différentes cellules hôtes possibles) (Cianciotto, 2009).

Les gènes *LspFGHIJK* (*Legionella secretion pathway*) codent pour des composants conservés d'un système de sécrétion de type II. Ce système présente en effet de fortes homologues avec la voie de sécrétion générale (GSP) de *P. aeruginosa*, codée par les gènes *xcp*. Mais il s'agit du plus gros système de sécrétion de type II connu chez les bactéries (Hales & Shuman, 1999, Rossier & Cianciotto, 2001, Lammertyn & Ann, 2004, Rossier, *et al.*, 2004, Rossier, *et al.*, 2008). Ce système implique le gène *pilD* (prétiline peptidase) également nécessaire à la synthèse des pili de type IV (chapitre 2.1.1.1) comme cela est aussi le cas chez *P. aeruginosa* (Hales & Shuman, 1999, Rossier & Cianciotto, 2001).

Les protéines sécrétées par ce système sont tout d'abord transloquées à travers la membrane interne grâce à un transporteur sec ou, dans une moindre mesure, un transporteur tat (Figure 3). Une fois dans le périplasme, les protéines prennent leur conformation tertiaire. Elles sont alors prises en charge par le système de sécrétion de type II pour leur faire traverser la membrane externe (Cianciotto, 2009).

Ce système de sécrétion est composé de 12 protéines « cœur ». Parmi elles, une ATPase cytoplasmique (*LspE*), mais aussi 3 protéines situées dans la membrane interne afin de former une plateforme et un site de liaison à *LspE* (*LspFLM*), des pseudopilines principales et secondaires (*LspFGHIJK*) forment une structure ressemblant à un pilus dans l'espace transmembranaire. Une peptidase (*PilD*) présente également dans la membrane interne et commune au système de sécrétion de type IV, permet le transfert et la maturation des pilines en amont de leur association en pseudo-pilus. Une sécrétine (*LspD*) située dans la membrane externe forme un pore de sécrétion. La connexion entre la partie située dans la membrane interne et la membrane externe est effectuée grâce à *LspC* (Rossier & Cianciotto, 2001, Rossier, *et al.*, 2004, Cianciotto, 2005, Cianciotto, 2009).

Les protéines *LspC* ou *LspD* permettent la reconnaissance des protéines devant être prise en charge par le système de sécrétion. Puis, en utilisant l'énergie générée au niveau de la membrane interne (*LspE*), le pseudopilus agit comme un piston poussant les protéines à travers la membrane externe au niveau du pore de sécrétion (Cianciotto, 2009).

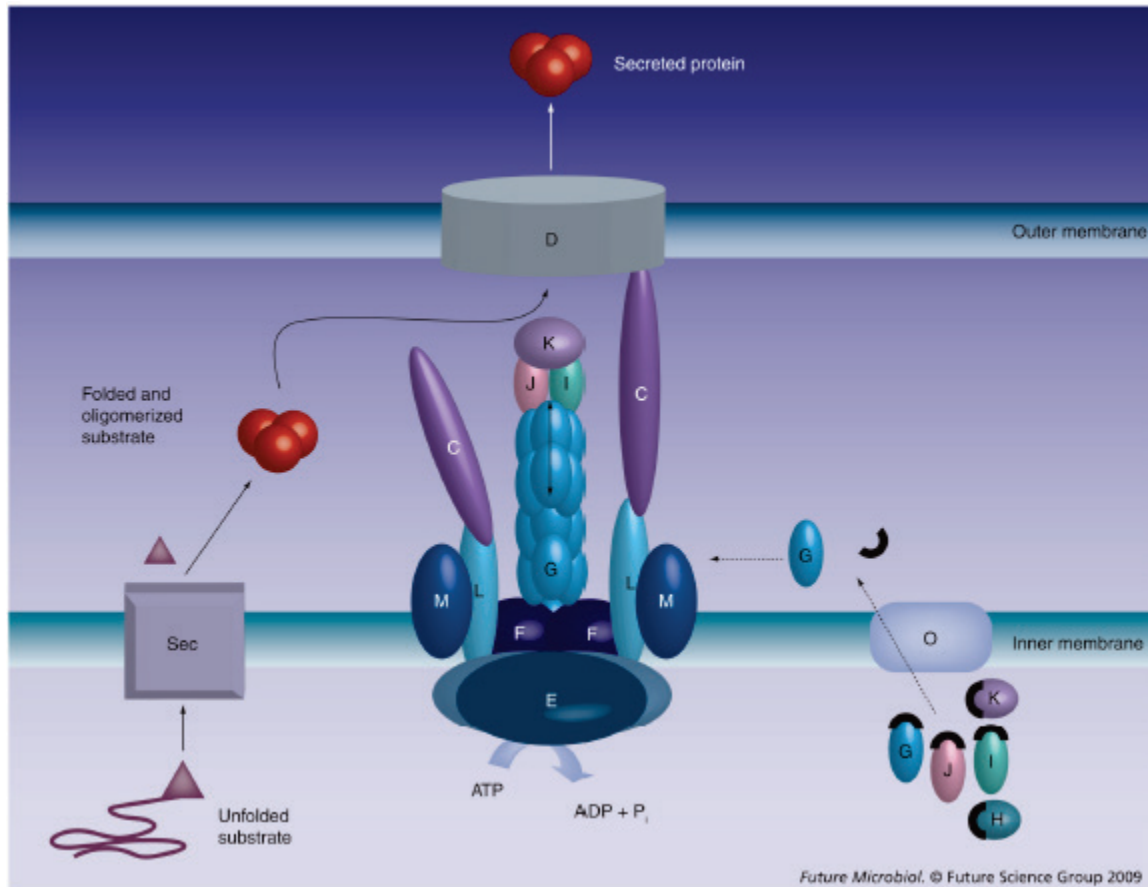


Figure 3: Modèle d'un système de sécrétion de type II (la protéine O correspond chez *Lpn* à la protéine PilD) (Cianciotto, 2009)

Ce système est impliqué dans le processus de réplication dans *H. vermiformis* et *A. castellanii* (Rossier & Cianciotto, 2001, Rossier, *et al.*, 2004). De 25 à 60 protéines peuvent être excrétées par ce système qui présentent au moins 14 activités enzymatiques différentes : métalloprotéases, phosphatases acides, lipases, phospholipase A, phospholipase C, lysophospholipase A, cholestérol acyltransferase et RNases. Il produit également des aminopeptidases dont LapA et LapB qui présentent des activités enzymatiques distinctes et complémentaires, impliquées dans le catabolisme de peptides exogènes, mais non nécessaires au processus d'infection (Hales & Shuman, 1999, Rossier & Cianciotto, 2001, Rossier, *et al.*, 2004, Rossier, *et al.*, 2008). Parmi les enzymes sécrétées, les principales sont des protéases et des peptidases, ce qui est en accord avec les exigences nutritives de *Lpn* en milieu de culture. La présence de chitinases et d'endoglucanases suggèrent que *Lpn* est capable de dégrader et d'utiliser des molécules plus complexes (Cianciotto, 2009).

L'une des protéines sécrétées est la protéine Msp (Major secretory protein). Il s'agit d'une zinc métalloprotéase de 38 kDa qui présente une activité caséinolytique et hémolytique. Cette métalloprotéase est nécessaire à l'infection de *H. vermiformis* mais pas d'*A. castellanii* ni des macrophages. Elle aiderait *Lpn* à obtenir les acides aminés nécessaires mais il est également possible qu'elle dégrade des facteurs de la cellule hôte contrôlant la croissance bactérienne ou qu'elle active d'autres protéines sécrétées par *Lpn* permettant la multiplication intra-cellulaire. Elle joue donc un rôle important dans l'écologie de *Lpn* (Hales & Shuman, 1999, Rossier & Cianciotto, 2001, Rossier, *et al.*, 2004, Rossier, *et al.*, 2008).

Le système de sécrétion codé par l'opéron *lsp* d'une part, ou d'autre part chacune des protéines qu'il sécrète ne sont pas requis pour la mort des macrophages, mais ils sont requis dans le processus de croissance intra-cellulaire dans les amibes. Msp semble être un facteur de virulence même s'il n'est pas requis pour la multiplication dans les macrophages et ainsi que dans *A. castellanii*. Une ou plusieurs autres protéines, sécrétées par ce système sont requises pour la multiplication dans *A. castellanii*. Son rôle dans l'infection des macrophages est modeste et semble dépendre de la souche de *Lpn*, du type d'essais cytopathologiques ou de la lignée des macrophages utilisés (Hales & Shuman, 1999, Rossier & Cianciotto, 2001). Ce système est le seul système de sécrétion de type II qui soit impliqué dans un mécanisme d'infection intra-cellulaire (Rossier, *et al.*, 2004).

Ce système est également responsable de changements dans la morphologie des colonies de *Lpn*. Il est possible que des déterminants de surfaces et/ou sécrétés soient une partie de ce système de virulence. Ce système peut intervenir dans la localisation des protéines de l'enveloppe cellulaire (Rossier & Cianciotto, 2001, Rossier, *et al.*, 2004). Parmi ses nombreux rôles, il est aussi, à l'origine, directement, ou indirectement, de l'excrétion d'un surfactant permettant à *Lpn* de glisser sur une surface (phénomène de sliding : (Stewart, 2009)).

Notons que la croissance intra-cellulaire est possible essentiellement du fait des molécules sécrétées et non pas par les modifications de la structure de l'enveloppe cellulaire engendrées par ce système de sécrétion (Rossier, *et al.*, 2009).

Parmi les nombreuses enzymes sécrétées par le système de sécrétion de type II, une RNase est codée par le gène *srnA* (secreted ribonuclease A). C'est la principale RNase sécrétée par *Lpn*. Il s'agit d'une protéine de 38 kDa contenant une séquence signal sec-dépendante et qui ne nécessite pas d'activation par l'une des métalloprotéases. Cette enzyme n'est pas nécessaire à la multiplication extra-cellulaire dans des conditions de laboratoire. Elle n'influence ni le système de sécrétion en lui-même, ni la morphologie des colonies. Elle n'est pas non plus requise dans le cas de l'infection de cellules ou de tissus de mammifère. Dans le cas de l'infection de protistes et plus particulièrement de *H. vermiformis*, elle n'a pas de rôle dans les premiers stades de l'infection, mais elle est impliquée plus tardivement dans la phase répliative. Dans ce cas, il est possible que *SnrA* favorise l'acquisition des nutriments en dégradant des ARN de la cellule hôte afin d'obtenir des nucléotides (ou fragments de nucléotides) ou des groupements phosphates. Elle peut également altérer les fonctions de la cellule hôte en dégradant ses ARN. Elle peut aussi posséder une seconde activité enzymatique nécessaire à l'infection intra-cellulaire, mais l'hypothèse d'une action directe de l'enzyme sur la bactérie elle-même reste la plus plausible. Cette RNase, tout comme d'autres nucléases pouvant être sécrétées, est importante lorsque l'environnement nutritif de *Lpn* est limité mais aussi lorsque la compétition et la prédation sont fortes (Rossier, *et al.*, 2009).

Ce système permet à *Lpn* de se développer dans une large gamme de conditions allant des eaux froides jusqu'à la multiplication intra-cellulaires à la fois chez les macrophages et les amibes (Stewart, 2009). L'expression de *pilD* est influencée par la température : l'initiation de sa transcription augmente avec la baisse de la température. La protéine ensuite produite (*PilD*) est alors nécessaire pour la croissance de *Lpn* à basse température (Söderberg, *et al.*, 2004, Söderberg, *et al.*, 2008). Cette protéine (enzyme permettant de donner la forme mature de la piline) est impliquée dans deux systèmes de sécrétions, les pili de type IV d'une part et le système de sécrétion de type II, mais seul le système de sécrétion de type II est impliqué dans le phénomène de croissance à basse température que ce soit en milieu de culture, mais également dans des conditions aquatiques environnementales ou lors du processus de répliation intra-amibienne. Son importance augmente donc avec la diminution de la température. L'identification de la protéine impliquée reste à faire. Elle représente peut-être, avec d'autres exoprotéines ainsi sécrétées, un nouveau mécanisme d'adaptation au froid (Söderberg, *et al.*, 2004, Söderberg, *et al.*, 2008).

2.3.2.2.3 Les systèmes de sécrétion de type IV

Lpn possède deux système de sécrétion de type IV capable d'interagir entre eux: le système *dot/icm* (type IVB) et le système *lvh* (type IVA) (Segal, *et al.*, 1999).

2.3.2.2.3.1 Le système *dot/icm*

Un groupe de 24 gènes est impliqué à la fois dans le processus d'inhibition de la fusion phagosome-lysosome et dans la réplication intra-cellulaire : ces gènes forment le système *dot/icm* (defect in organelle trafficking/intracellular multiplication). L'ensemble de ces gènes est localisé dans deux régions distinctes du chromosome bactérien et la majorité d'entre eux codent pour des protéines associées à la membrane (Coers, *et al.*, 1999, Swanson & Hammer, 2000, Faulkner & Garduno, 2002). Ce complexe constitue un système de sécrétion ressemblant à un système de sécrétion de type IV capable de transférer des molécules effectrices dans le cytoplasme de la cellule hôte afin de s'échapper de la voie de dégradation de l'endocytose. Le système délivre des protéines de virulence dans le phagosome qui le transforme en vacuole de réplication (phagosome réplcatif) dans lequel *Lpn* est alors protégé (Swanson & Hammer, 2000, Molmeret, *et al.*, 2002).

Ce système *dot/icm* est également impliqué dans les processus de conjugaison (Molmeret, *et al.*, 2004). Les protéines qu'il produit à ce sujet jouent un rôle dans la sécrétion à travers la membrane de plasmides ainsi que de facteurs de virulence (Swanson & Hammer, 2000).

En résumé, ce système permet de transporter plus de 40 protéines « effectrices » dans la cellule hôte (Tiaden, *et al.*, 2007) et de ce fait, il est reconnu comme le facteur de virulence clé de *Lpn* (Tiaden, *et al.*, 2010).

2.3.2.2.3.2 Le système *lvh*

Le système de sécrétion *lvh* (*Legionella vir homologs*) est également un système de sécrétion de type IV. Il est composé de 11 gènes. Les protéines de ce système présentent une forte homologie avec les protéines Vir de *Agrobacterium tumefaciens*, *Helicobacter pylori* et *Bordella pertussis*. Les premières observations ne lui donnaient pour rôle que la possibilité de remplacer certains composants du système *dot/icm* dans le processus de conjugaison. Elles ne lui donnaient aucun rôle dans les processus de croissance intra-cellulaire (Segal, *et al.*, 1999). Dans les conditions environnementales qui favorisent la propagation de *Lpn*, le système *lvh* apparaît impliqué dans la mise en place des phénotypes de virulence (en particulier impliquant des amibes). Le système peut compenser des mutations du système *dot/icm*. Il est alors requis principalement pour empêcher l'acidification de la vacuole contenant *Lpn*. Dans ces conditions proches des conditions environnementales et dans les amibes enkystées, *Lpn* préférerait le système *lvh* au système *dot/icm* pour l'expression du phénotype virulent (Bandyopadhyay, *et al.*, 2007).

2.3.2.3 Processus de multiplication intra-cellulaire impliquant les protistes

Quel que soit le type de cellule hôte (protiste ou macrophage), l'entrée dans l'environnement intra-cellulaire s'effectue en plusieurs étapes (Samrakandi, *et al.*, 2002) :

- identification et rencontre avec une cellule hôte appropriée,
- adhésion à cette cellule,
- transduction du signal
- entrée proprement dite
- mise en place des mécanismes de survie initiale.

Une fois entrées dans la cellule hôte, *Lpn* modifie la vacuole dans laquelle elle se trouve pour former une vacuole de réplication où elle se multiplie. Elle s'échappe ensuite de la cellule hôte après avoir lysé cette dernière. Les phases successives du cycle de développement sont représentées sur la Figure 4 et décrites dans les paragraphes qui suivent.

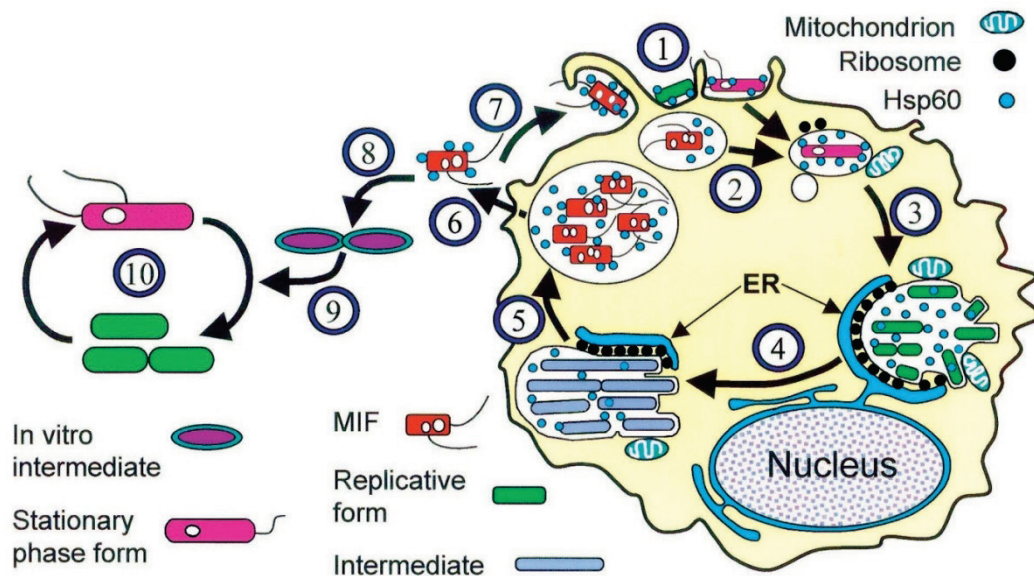


Figure 4 : Cycle de développement intra-cellulaire de *Lpn* dans les protistes (Faulkner & Garduno, 2002)

2.3.2.3.1 Identification et rencontre de la cellule hôte

L'identification et la rencontre avec la cellule hôte font principalement intervenir des processus de motilité qui impliquent un ou plusieurs flagelles. La présence du flagelle augmente les capacités d'invasion de la cellule hôte par *Lpn*, mais n'est pas requise pour la réplication intra-cellulaire. Il facilite, en effet, la rencontre initiale entre *Lpn* et la cellule hôte (macrophage ou protiste) et permet alors d'initier l'entrée de *Lpn*. Sa présence est d'autant plus importante dans l'environnement où le nombre de cellules hôtes est limité (Dietrich, *et al.*, 2001, Samrakandi, *et al.*, 2002, Heuner & Steinert, 2003). L'ensemble des gènes impliqués dans le système de régulation du flagelle (*flaA*, *fliA*, *flaR*, *rpoS* et *rpoN* ; chapitre 2.1.1.4.1) sont donc importants pour cette étape.

2.3.2.3.2 Attachement à la cellule hôte et transfert du signal

L'attachement à la cellule hôte s'effectue différemment en fonction du type d'hôte, selon qu'il s'agit d'un macrophage ou d'un protiste (Fields, 1996, Gao, *et al.*, 1997). Le mécanisme d'attachement à la cellule hôte est même variable en fonction de l'espèce d'amibe considérée (Steinert, *et al.*, 2002, Declerck, *et al.*, 2007). Mais d'une manière générale, elle peut s'effectuer grâce à deux types d'adhésines bactériennes : les pili et les non-pili (Samarakandi, *et al.*, 2002).

Lpn produit deux types de pili : des longs (0.8 à 1.5 μm) ou des courts (0.1 à 0.6 μm). Les pili les plus longs sont des pili de type IV appelés CAP (Pili associés à la Compétence et à l'Adhérence) et proviennent de l'expression des gènes *pilBCD* et *E_L*, dont les trois premiers constituent un opéron. Ils jouent un rôle dans l'attachement à une cellule hôte (mammifères ou protistes) dans laquelle *Lpn* se réplique, mais n'interviennent pas ensuite pour la survie et la réplication une fois l'entrée dans la cellule hôte effectuée. Ils confèrent également à *Lpn* un avantage sélectif pour son adhésion à des surfaces et des biofilms dans l'environnement (Abu Kwaik, *et al.*, 1998, Liles, *et al.*, 1998, Stone & Abu Kwaik, 1998).

Les gènes *pilBCD* et *E_L* sont des gènes homologues à ceux présents dans d'autres genres bactériens. La protéine PilB se situe du côté cytoplasmique de la membrane interne, elle possède un site de liaison pour l'ATP pouvant fournir de l'énergie nécessaire au passage de la prépiline à travers la membrane interne. PilC est une protéine plus spécifique en raison de son domaine transmembranaire, dont le rôle est de faciliter la translocation de la piline. PilD est quant à elle une enzyme dont le rôle est de cliver la séquence leader hydrophobe de la prépiline et de méthyliser le premier résidu afin de produire un monomère de piline mature dans le périplasma. Les sous-unités de piline s'associent ensuite au sein de la structure du pilus. Chez d'autres espèces bactériennes gram -, des protéines homologues à PilB et PilC permettent à la prépiline de traverser la membrane interne (Liles, *et al.*, 1998, Stone & Abu Kwaik, 1998, Liles, *et al.*, 1999, Lammertyn & Ann, 2004).

Le gène responsable des pili de type CAP, *pilE_L*, est présent dans les 13 sérogroupes de *Lpn* testés, toutes les *Lpn* sont donc capables de les produire (Stone & Abu Kwaik, 1998).

Le gène *pilD* est requis pour la sécrétion de multiples activités enzymatiques. Il permet également la croissance intra-cellulaire de *Lpn* à la fois dans les amibes et dans les cellules U937, avec une importance plus marquée avec les hôtes protozoaires. De plus, le système de sécrétion de type II (*Isp*) dépend de PilD qui facilite alors l'infection intra-cellulaire (Rossier, *et al.*, 2004).

La synthèse des pili est dépendante de la température : la transcription des locus *pilBCD* est intense à 30°C mais devient minimale à 37°C (Liles, *et al.*, 1998). Les fonctions de mobilité et d'adhérence de *Lpn* sont donc optimales pour des températures inférieures à 37°C, favorisant ainsi le contact avec les protistes pour ces températures. Ceci montre l'importance de l'environnement aquatique dans l'évolution de *Lpn* en tant que parasite intra-cellulaire (Swanson & Hammer, 2000).

L'attachement de *Lpn* à *Hartmanella* s'effectue à travers le récepteur Galactose/N-acétylgalactosamine (Gal/GalNAc) qui est une lectine de 170 kDa (Venkataraman, *et al.*, 1997, Steinert, *et al.*, 2002). Chez *H. vermiformis*, la fixation de *Lpn* à ces récepteurs engendre une déphosphorylation des tyrosines de nombreuses protéines de la cellule hôte, dont le récepteur Gal/GalNAc lui-même ainsi que des protéines associées au cytosquelette. Ces déphosphorylations provoquent alors des cassures du cytosquelette empêchant ensuite le détachement de *Lpn* (Venkataraman, *et al.*, 1998).

Contrairement aux amibes du genre *Hartmanella*, *A. castellanii* utilise plusieurs mécanismes au cours du processus de fixation de *Lpn* à sa surface (Steinert, *et al.*, 2002). La fixation s'effectue à travers des interactions entre les oligosaccharides présents à la surface de *Lpn* et un récepteur de type lectine fixant le mannose (MBL, mannose-binding lectin) associé à la membrane de l'amibe (Declerck, *et al.*, 2007).

Dans le cas de *Naegleria lovaniensis*, le récepteur impliqué dans l'attachement de *Lpn* est une lectine fixant la N-acetyl-D-galactosamine (Declerck, *et al.*, 2007).

2.3.2.3.3 Entrée dans la cellule hôte

L'attachement des bactéries à la surface des protistes est suivi du processus d'entrée dans la cellule, c'est-à-dire de la phagocytose proprement dite (Venkataraman, *et al.*, 1998).

Il peut s'agir d'une phagocytose classique, mais, le plus souvent chez les amibes, comme chez *A. castellanii*, il s'agit d'une phagocytose enroulante. Contrairement à la phagocytose classique, la phagocytose enroulante est un processus asymétrique au cours duquel un long pseudopode, aussi appelé filopode, formé par la cellule hôte s'enroule autour de la bactérie de manière à l'enfermer dans une vacuole qui s'internalise dans le cytoplasme de la cellule hôte (Horwitz, 1984, Bozue & Johnson, 1996, Samrakandi, *et al.*, 2002, Steinert, *et al.*, 2002).

Au cours de la phagocytose, il est possible que d'autres espèces bactériennes se trouvent dans la même vacuole que *Lpn*, toutefois les récepteurs impliqués dans l'étape d'attachement rendent la phagocytose plus spécifique (Declerck, *et al.*, 2005).

La protéine de choc thermique de 60 kDa, Hsp60, est également impliquée dans l'attachement et l'entrée de *Lpn* dans une cellule hôte, même si son mode d'action n'est pas bien connu (Swanson & Hammer, 2000).

Les *Lpn* ainsi internalisées peuvent être sous différents états physiologiques : il peut s'agir de formes répliquatives, de formes en phase stationnaires ou de formes intra-cellulaires matures (MIF) (chapitre 2.1.1.4). Les formes VNBC sont également phagocytées, car la baisse de l'activité métabolique de *Lpn* au cours de l'état VBNC n'engendre pas de baisse dans l'efficacité des processus de phagocytose par les amibes. Dans le phagosome, les formes en phase stationnaire ainsi que les MIF vont réguler l'expression de nombreux gènes conduisant, entre autres, à la perte de leur flagelle et au retour à la forme répliquative (Bozue & Johnson, 1996, Gao, *et al.*, 1997, Steinert, *et al.*, 1997, Faulkner & Garduno, 2002, Molofsky & Swanson, 2004).

2.3.2.3.4 Mise en place des mécanismes de survie, formation de la vacuole de réplication

Alors que l'entrée dans la cellule hôte est un processus spécifique du type d'hôte (protiste, macrophage) ou même de l'espèce de protiste impliquée, le processus infectieux semble ensuite identique dans les amibes et dans les macrophages (Bozue & Johnson, 1996, Fields, 1996).

La vacuole ainsi que la morphologie et la physiologie des *Lpn* contenues dans les vacuoles se modifient au cours du processus de multiplication intra-cellulaire (Rowbotham, 1980, Kilvington, 1990, Cirillo, *et al.*, 1994, Bozue & Johnson, 1996, Faulkner & Garduno, 2002, Greub & Raoult, 2003). Il se forme une vacuole de réplication qui ne fusionne pas avec le lysosome. Chez les souches cliniques, l'inhibition de la fusion entre le phagosome et le lysosome est corrélée avec la virulence de *Lpn*, mais ceci n'est pas le cas pour les souches environnementales (Bozue & Johnson, 1996).

Immédiatement après la phagocytose, la surface du phagosome contient des protéines originaires de la membrane plasmique du protiste telles que des 5'-nucléotidases et du CR3. Ces protéines disparaissent rapidement de la surface du phagosome tandis qu'à l'inverse, de nombreuses vésicules s'y fixent du côté cytoplasmique. Ainsi les phagosomes contenant *Lpn* dans un état virulent, n'acquièrent pas les caractéristiques nécessaires à la fusion avec les lysosomes (acidification par la présence de phosphatase acide ou de ferritine). Le pH de la vacuole reste neutre, la vacuole ne fusionne pas avec le lysosome et se transforme en vacuole de réplication (Abu Kwaik, 1996, Bozue & Johnson, 1996, Gao, *et al.*, 1997).

Les systèmes de sécrétions de type IV *dot/icm* et *lvh* sont impliqués dans l'inhibition de la fusion avec le lysosome chez *A. castellanii* (Coers, *et al.*, 1999, Swanson & Hammer, 2000, Faulkner & Garduno, 2002, Bandyopadhyay, *et al.*, 2007). Le facteur sigma RpoS est également impliqué dans l'évasion de la voie lysosomale classique, en particulier chez *A. castellanii* (Byrne & Swanson, 1998, Hales & Shuman, 1999, Hammer & Swanson, 1999, Bachman & Swanson, 2001, Steinert, *et al.*, 2002, Bachman & Swanson, 2004, Molofsky & Swanson, 2004, Taden, *et al.*, 2010).

Le phagosome interagit ensuite avec les mitochondries de la cellule hôte avant de s'entourer de réticulum endoplasmique rugueux originaire de la cellule hôte. Ceci s'effectue en moins de 4 heures chez *A. polyphaga* (Abu Kwaik, 1996, Gao, *et al.*, 1997, Venkataraman, *et al.*, 1998, Shadrach, *et al.*, 2005). Le rôle exact du réticulum endoplasmique sur la réplication de *Lpn* n'est pas identifié. On sait tout de même qu'il ne représente pas une source de protéines pour *Lpn* (Abu Kwaik, *et al.*, 1998, Molmeret, *et al.*, 2004). La protéine LsqR, du système de sécrétion *Isq* est impliquée plus particulièrement dans l'acquisition du réticulum endoplasmique et la formation de la vacuole de réplication dans les amibes et les macrophages (Taden, *et al.*, 2010).

La formation de la vacuole répliquative requiert les systèmes de sécrétion de type IV et implique plus de 150 protéines « effectrices » (Taden, *et al.*, 2010).

2.3.2.3.5 Réplication intense de *Lpn*

Dans ces vacuoles, *Lpn* se réplique par fission binaire (Shadrach, *et al.*, 2005). Au fur et à mesure des cycles de réplication, la morphologie de *Lpn* se modifie. Elle prend tout d'abord une forme intermédiaire. Puis, lorsque la phase de réplication se termine, *Lpn* prend sa forme intra-cellulaire mature (Faulkner & Garduno, 2002, Greub & Raoult, 2003, Molofsky & Swanson, 2004). Le temps de génération observé lors de la réplication intra-cellulaire est 3 fois moins important que le temps de génération observée lors de la croissance extra-cellulaire en milieu de culture. La forme intra-cellulaire mature a acquis un phénotype virulent, elle présente de nombreuses inclusions cytoplasmiques ainsi qu'un ou deux flagelles en position subpolaire (Faulkner & Garduno, 2002, Greub & Raoult, 2003, Molofsky & Swanson, 2004). Les facteurs présentés dans le chapitre 2.1.1.4 sont également impliqués dans cette étape. Le système de sécrétion *lsp* est également impliqué car il facilite l'acquisition des nutriments dans l'amibe et plus particulièrement l'excrétion d'une RNase (SrnA) qui joue ce rôle chez *H. vermiformis* (Hales & Shuman, 1999, Rossier & Cianciotto, 2001, Rossier, *et al.*, 2004, Rossier, *et al.*, 2009).

Le gène *mip* (macrophage infection potentiator) est responsable de la production d'un facteur de virulence qui est une protéine de surface de 24 kDa (Cianciotto, *et al.*, 1989, Engleberg, *et al.*, 1989). Cette protéine présente une activité peptidyl-prolyl-*cis/trans* isomérase. Ce type d'enzyme est habituellement caractéristique des cellules eucaryotes, elle cible donc des substrats dans la cellule hôte (Swanson & Hammer, 2000). Ce facteur n'est pas nécessaire à l'entrée de *Lpn* dans la cellule hôte, il permet par contre de promouvoir la multiplication intra-cellulaire dans les macrophages (Cianciotto & Fields, 1992).

2.3.2.3.6 Evasion de la cellule hôte

La mort cellulaire peut intervenir à travers deux grands mécanismes : l'apoptose et la nécrose. La nécrose est caractérisée par des dommages physiques conduisant à la mort de la cellule, tandis que l'apoptose est un suicide programmé de la cellule qui se manifeste par des modifications morphologiques et biochimiques de la cellule différentes de celles induisant la nécrose (Molmeret, *et al.*, 2004).

Ces deux mécanismes peuvent être utilisés par *Lpn* pour sortir des macrophages. Au cours des premiers stades d'infection, *Lpn* induit l'apoptose à travers l'activation de la caspase-3. Tandis qu'en phase de croissance post-exponentielle, *Lpn* est responsable d'une nécrose de la cellule hôte en induisant la formation de pores (Steinert, *et al.*, 2002).

Bien que les amibes possèdent les enzymes nécessaires à l'apoptose, la sortie de *Lpn* ne s'effectue pas grâce à ce mécanisme, mais uniquement par le processus de nécrose. Comme pour le mécanisme d'attachement, la sortie de la cellule hôte s'effectue donc différemment selon le type de cellule hôte (Hägele, *et al.*, 1998). La sortie par le processus de nécrose s'effectue en 3 étapes. Après la phase de croissance exponentielle de *Lpn*, des pores se forment au niveau de la membrane des phagosomes, libérant ainsi les bactéries dans le cytoplasme de la cellule hôte. C'est ensuite la membrane plasmique et les organelles de la cellule hôte qui se percent, conduisant à la mort de la cellule et à la sortie de *Lpn* (Molmeret, *et al.*, 2004).

La libération de *Lpn* par le mécanisme de nécrose et la formation de pores chez les protistes a tout d'abord été montrée chez *A. Polyphaga*. Cette capacité de *Lpn* à former des pores ne s'exprime que lorsqu'elle se trouve sous une forme infectieuse, telle que la forme MIF (Gao & Abu Kwaik, 2000). Le complexe de gènes *dot/icm* est impliqué dans le processus de formation des pores, plus particulièrement à travers le gène *icmT*, que ce soit dans les macrophages ou dans *A. castellanii*. A l'inverse le système de sécrétion de type II n'est pas impliqué dans ce processus (Segal & Shuman, 1999, Molmeret, *et al.*, 2002).

De nombreuses *Lpn* sous forme MIF sont ainsi relarguées dans l'environnement, elles peuvent alors être à nouveau phagocytées par un nouvel hôte et ainsi initier un nouveau cycle de multiplication intra-cellulaire. Elle peut également se maintenir dans l'environnement dans une forme intermédiaire capable de se répliquer. Cette forme se différencie ensuite en une forme répliquative. (Faulkner & Garduno, 2002, Molofsky & Swanson, 2004). La réplication intra-cellulaire modifie l'expression protéique de *Lpn* afin d'augmenter ses capacités d'invasion de nouvelles cellules eucaryotes (Cirillo, *et al.*, 1994).

2.3.2.3.7 Conclusion sur les relations entre *Lpn* et les protistes

L'environnement intra-cellulaire est donc favorable à la croissance de *Lpn*, ce qui vient à l'appui du statut que l'on prête aux protistes comme hôtes naturels pour les *Lpn* (Cirillo, *et al.*, 1994).

Les amibes infectées par *Lpn* deviennent des particules infectieuses et représentent un risque pour l'humain. Lorsque des protistes sont inhalés par des humains simultanément à *Lpn*, les protistes peuvent alors servir de cofacteur vis-à-vis du caractère pathogène de *Lpn* (Brieland, *et al.*, 1997, Atlas, 1999). De plus, le développement intra-cellulaire rend difficile l'éradication des légionelles dans l'environnement car les protistes leur confèrent une protection contre la désinfection à l'aide de produits chimiques (Barbaree, *et al.*, 1986, Barker, *et al.*, 1992, Fields, 1996).

La croissance intra-amibienne modifie l'état physiologique et la sensibilité de *Lpn* aux antibiotiques (Barker, *et al.*, 1992, Barker, *et al.*, 1993, Barker, *et al.*, 1995). De plus, le passage par les amibes permet de favoriser la présence de légionelles pathogènes, car les souches avirulentes ne sont pas capables d'avoir une réplication intra-cellulaire (Moffat & Tompkins, 1992). Les cellules de *Lpn* qui se sont multipliées dans des amibes sont plus infectieuses sur les lignées cellulaires de macrophages que celles issues de culture en milieu liquide (Cirillo, *et al.*, 1994) ; il est donc possible que la multiplication dans les amibes active des gènes nécessaires à l'infection des humains (Polesky, *et al.*, 2001).

La multiplication intra-cellulaire s'effectue dans les amibes qui sont sous forme trophozoïte. Lorsque les conditions environnementales sont mauvaises, les amibes peuvent s'enkyster. Si l'amibe est infectée par *Lpn* lors de l'enkystement, les kystes sont eux aussi infectés. *Lpn* est alors protégée des conditions externes et des agents physiques et biochimiques utilisés pour son éradication (température, large gamme de biocides, hyperchloration). L'enkystement peut se maintenir pendant une période plus ou moins longue. Ce phénomène a été montré chez plusieurs espèces d'amibes telles que *N. lovaniensis* et *Acanthamoeba spp.* Par contre, *Lpn* n'est pas capable d'infecter des kystes matures (Skinner, *et al.*, 1983, Kilvington, 1990, Abu Kwaik, *et al.*, 1998, Greub & Raoult, 2003, Declerck, *et al.*, 2005, Bouyer, *et al.*, 2007). Ce phénomène permet d'expliquer la réapparition de la bactérie plusieurs semaines à plusieurs mois après un épisode de décontamination d'un réseau d'eau. De plus, des kystes d'*Acanthamoeba polyphaga* ont été retrouvés dans l'atmosphère ; il est donc possible qu'ils permettent à *Lpn* de coloniser de nouveaux environnements (Kilvington, 1990).

Certaines amibes sont capables de produire des vésicules au cours de la multiplication intra-cellulaire de *Lpn*, vésicules qui, de ce fait, contiennent la bactérie sous sa forme MIF. Grâce à ces vésicules, *Lpn* peut se maintenir dans un état cultivable pendant 6 mois dans un milieu pauvre. Ces vésicules sont d'une taille respirable (< 5 µm) et peuvent contenir entre 20 et 200 *Lpn*. Lorsqu'elles sont produites dans les TAR, ces vésicules peuvent être transportées par les aérosols. Elles jouent donc un rôle important dans la dissémination et la persistance de *Lpn* dans l'environnement. Elles lui fournissent une protection face aux biocides et à certains antibiotiques tels que la gentamicine, mais également une protection en cas de congélation (Berk, *et al.*, 1998, Greub & Raoult, 2003, Bouyer, *et al.*, 2007).

De la même manière, les ciliés tels que *Tetrahymena spp* produisent des vésicules, ou pelotes, contenant *Lpn*. Ces vésicules sont associées à des fragments membranaires d'origine bactérienne. Leur formation semble corrélée à une perte de la viabilité ou seulement de la cultivabilité de *Lpn*, et implique le système de sécrétion *dot-icm*. Comme dans le cas des vésicules produites par les amibes, ces pelotes ont des implications épidémiologiques et écologiques car elles permettent une distribution plus large de *Lpn* et peuvent favoriser le contact avec des humains et donc la transmission de la légionellose (Berk, *et al.*, 2008).

Il a été montré récemment qu'en addition au développement intra-cellulaire au sein des protistes, *Lpn* peut utiliser des métazoaires comme organismes hôtes. C'est le cas du ver *Caenorhabditis elegans* (Brassinga, *et al.*, 2010). Les auteurs montrent que *Lpn* peut coloniser et se maintenir dans le tractus digestif de ce nématode que ce soit au cours de tests in vitro ou dans un environnement terrestre artificiel. La colonisation des nématodes peut même être durable, avec une transmission de la bactérie à leur descendance. La durée de vie de *C. elegans* contaminé est plus courte. *Lpn* s'y différencie en une forme cystique hautement infectieuse. Selon Brassinga, *et al.* (2010), les facteurs responsables de la virulence dans le tractus intestinal des nématodes seraient différents de ceux qui interviennent dans les autres cellules hôtes (protistes et macrophages) (Brassinga, *et al.*, 2010).

En elle-même, *Lpn* n'est pas adaptée à l'hôte humain. Ce sont les nouvelles niches environnementales ainsi que les changements de comportement humains qui ont conduit à considérer *Lpn* comme un risque pour la santé publique. Les protistes sont également parmi les forces principales dans l'évolution vers la pathogénicité de *Lpn* (Swanson & Hammer, 2000, Steinert, *et al.*, 2002).

2.4 *Lpn* dans les biofilms

Le rôle des biofilms n'est plus à démontrer dans le maintien de *Lpn* à la fois dans l'environnement et dans les installations humaines.

Après un cycle de développement intra-cellulaire dans un protiste, de nombreuses *Lpn* sont libérées dans la colonne d'eau, et peuvent alors infecter un nouvel hôte pour effectuer un nouveau cycle de développement intra-cellulaire. Mais les *Lpn* libérées peuvent aussi coloniser des biofilms (Figure 5) qui lui fournissent alors une protection, en particulier face aux biocides présents dans la colonne d'eau. *Lpn* peut s'échapper des biofilms soit à l'état libre, soit par le biais du protiste qu'elle colonise, pour rencontrer un nouvel hôte et initier un nouveau cycle de réplication (Molofsky & Swanson, 2004).

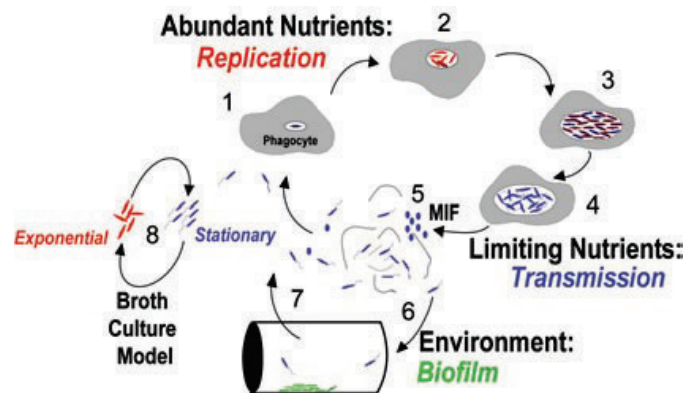


Figure 5: cycle de développement de *Lpn* dans l'environnement (Molofsky & Swanson, 2004) (étapes 1 à 4 : réplication intra-cellulaire dans les protistes, *Lpn* prend tout d'abord une forme réplication puis sa Forme Intra-cellulaire Mature ; 5 : libération de *Lpn* dans l'environnement ; 6 : en absence de nouvel hôte *Lpn* colonise un biofilm ; 7 : Retour de *Lpn* à l'état planctonique suivie d'une phagocytose par un nouvel hôte ; 8 : alternance entre la forme répliative et la forme transmissive en milieu de culture)

2.4.1 Définition et structure des biofilms

2.4.1.1 Découverte et Définition

Les premières observations de biofilms en eau douce datent de 1933 lorsque Henrici plonge des lames de microscopie dans un aquarium d'eau douce, pendant une semaine, dans le but d'étudier la croissance algale. Dès les premiers jours, il observe un dépôt bactérien qui s'intensifie ensuite jusqu'à recouvrir entièrement la lame. Cette couche bactérienne peut devenir si dense qu'il devient alors difficile de distinguer les cellules bactériennes. Il ne s'agit pas d'un simple dépôt sur la lame, mais d'une adhésion forte par une "sorte de colle" qui empêche le décrochage des bactéries et des colonies lors de passage de la lame sous un robinet. D'autres organismes comme des algues ainsi que des protistes sont également présents, mais aucun débris amorphe organique ou inorganique n'est observé (Henrici, 1933). Zobell est quant à lui l'un des pionniers dans l'étude des bactéries des biofilms en milieu marin. Il introduit le terme de "film bactérien" ou de "film de microorganismes" en raison de la présence d'un film de matière organique pouvant être produit par les bactéries elles-mêmes, et ne provenant pas de l'eau (Zobell, 1943).

Depuis, de nombreuses définitions ont été données au biofilm. Il peut être défini simplement comme une communauté structurée de cellules eucaryotes ou procaryotes située dans une matrice polymérique produite par les bactéries elles-mêmes, lui permettant d'adhérer à une surface inerte ou vivante, mais également au niveau de l'interface air-eau. La structure des biofilms n'est pas figée, c'est une structure dynamique dans laquelle circulent à tout moment des signaux de nature et d'origines très diverses qui indiquent aux bactéries de rejoindre ou de quitter le biofilm (Costerton, *et al.*, 1999, O'Toole, *et al.*, 2000, Karatan & Watnick, 2009). De cette communauté sessile, des fragments peuvent, en effet, se détacher, et des bactéries peuvent retourner individuellement à un état planctonique (nageantes ou flottantes) (Costerton, 2007).

Les biofilms peuvent se développer au niveau de 4 types d'interfaces :

- liquide – surface solide,
- liquide – air,
- entre deux liquides non miscibles
- surface solide – air.

Les biofilms qui se développent à l'interface solide-eau restent les plus étudiés (Nikolaev & Plakunov, 2007). Ils peuvent alors se former à la fois sur des surfaces abiotiques (minéraux, carapaces d'organismes morts...), mais aussi sur des surfaces biotiques telles que des plantes, d'autres microorganismes ou des animaux. Les algues épilithiques fournissent une surface fixée favorable au développement bactérien, car elles représentent également une source de nutriments pour les bactéries (Geesey, *et al.*, 1978, Karatan & Watnick, 2009).

2.4.1.2 Les organismes des biofilms

Les bactéries sont les organismes dominant des biofilms. Leur concentration est supérieure d'un facteur 10 à celle des autres organismes (Geesey, *et al.*, 1978, Pedersen, 1982, Hunt & Parry, 1998, Manz, *et al.*, 1999). De plus, dans un environnement naturel, la majorité des bactéries se situe dans les biofilms (95% à 99% des bactéries environnementales) à l'inverse des cellules en suspension dans la colonne d'eau (Bryers, 1982, Costerton, *et al.*, 1995, Costerton, 2007, Nikolaev & Plakunov, 2007).

Malgré des variations saisonnières et annuelles de sa composition et donc de son activité, le biofilm mature est généralement dominé par deux groupes bactériens : les *β -protéobactéries* et les bactéries du groupe *Cytophaga-Flavobacterium* (Manz, *et al.*, 1999, Chenier, *et al.*, 2003). Le développement du biofilm dans le temps correspond également à une succession d'espèces bactériennes (chapitre 2.4.2.4).

La colonisation d'un substrat est très rapide (Henrici, 1933, Zobell, 1943, Hunt & Parry, 1998, Pohlen, *et al.*, 2010). La concentration en bactéries totale dépasse les 10^4 bact/cm² dès les premières heures d'immersion d'une lame de verre dans une rivière, après 12h elle atteint 9×10^4 bact/cm². Un biofilm de 7 jours abrite 2×10^6 bact/cm². Quant aux biofilms matures, âgés de plusieurs mois, ils contiennent entre 5×10^6 et 15×10^7 bact/cm² (Lazar, Hunt & Parry, 1998, Stoodley, *et al.*, 2001, Pohlen, *et al.*, 2010).

Cette abondance de bactéries correspond au fait que le biofilm représente un milieu favorable à leur activité métabolique : la proportion d'organismes présentant une activité respiratoire est supérieure dans les biofilms par rapport à celle des communautés planctoniques (Araya, *et al.*, 2003). Mais le type d'interface où se développe le biofilm a aussi une influence sur sa communauté bactérienne : ceux de l'interface solide-eau possèdent une communauté bactérienne plus dense et plus active que ceux de l'interface air-eau. Ce phénomène s'explique par une concentration des nutriments au niveau des interfaces du type solide-eau (Araya, *et al.*, 2003).

En plus des bactéries, le biofilm abrite également des protistes et des algues. En termes de concentrations, les flagellés hétérotrophes représentent le groupe d'organismes le plus abondant après les bactéries. A l'inverse, les flagellés autotrophes et les chlorophytes sont les moins représentées dans les biofilms quel que soit leur niveau de maturation. En raison de leur taille, les bactéries contribuent assez peu à la biomasse du biofilm. Ce sont alors les algues qui représentent la majeure partie de la biomasse fixée : la production primaire du biofilm est donc importante (Geesey, *et al.*, 1978, Hunt & Parry, 1998).

Les 3 groupes de protistes (flagellés, ciliés, amibes) sont présents dans les biofilms d'eau douce, quel que soit le type de substrat, naturel ou artificiel (Parry, 2004). Ils sont importants dans ce milieu à la fois par une concentration comprise entre 10^2 et plus de 10^6 cellule/cm² et par leur fonction de brouteur au sein même du biofilm (Franco, *et al.*, 1998, Hunt & Parry, 1998, Kathol, *et al.*, 2009, Wey, *et al.*, 2009).

Les protistes associés aux biofilms peuvent être séparés en 4 catégories en fonction de leur mode de vie et par conséquent de leur impact sur le développement du biofilm (Parry, 2004) :

- Les protistes principalement planctoniques qui peuvent nager à proximité du biofilm.
- Les protistes fixés au substrat mais qui se nourrissent de proies en suspensions.
- Les protistes qui peuvent être planctoniques et se nourrir de proies en suspension mais qui sont aussi capable de parcourir le substrat et qui se nourrissent alors de proies fixées.
- Les amibes qui sont uniquement capables de parcourir le substrat et qui se nourrissent de proies fixées.

Une grande partie des protistes appartient donc à des groupes qui se nourrissent de proies en suspension dans la colonne d'eau plutôt que de proies présentes dans le biofilm : il s'agit principalement des ciliés et des rotifères. Ces protistes n'affectent donc pas directement l'état physiologique des bactéries du biofilms, mais ils occupent de l'espace sur le substrat. Par conséquent, ils limitent la colonisation par les autres organismes et augmentent la compétition spatiale. Ils permettent tout de même d'augmenter le flux d'éléments essentiels du biofilm à travers leur rôle dans la boucle microbienne (Hunt & Parry, 1998, Weitere, *et al.*, 2003, Parry, 2004, Kathol, *et al.*, 2009).

La composition taxonomique du biofilm est modifiée à travers le phénomène de broutage exercé par les protistes (Parry, 2004). En raison de leur petite taille (2-20 μm), les flagellés se nourrissent en sélectionnant la taille de leurs proies : les bactéries dont la taille est inférieure à 1.6 μm sont les plus vulnérables, tandis que celle supérieures à 2.4 μm sont les plus résistantes au broutage. Par ailleurs, chez ces organismes, chaque vacuole digestive ne contient qu'une seule proie (Parry, 2004).

Grâce à leur taille supérieure, les ciliés peuvent exploiter une plus grande diversité de proies, comme des algues, des flagellés ou même d'autres ciliés (Parry, 2004). Mais ils présentent un comportement alimentaire particulier, influencé par le micro-habitat et sa topographie. Les conséquences du broutage par les ciliés sont alors variables dans l'espace et dans le temps. Des mécanismes chimio-sensoriels semblent, en effet, leur permettre d'identifier et de localiser les zones du biofilm contenant plus de proies (bactéries). Ce phénomène paraît d'ailleurs plus important pour les espèces les moins mobiles, mais le mécanisme qui en est responsable n'est pas compris à ce jour (Dopheide, *et al.*, 2011). La composition de la communauté de ciliés est différente sur des biofilms développés sur des substrats naturels ou artificiels. Des espèces comme *Vorticella sp.*, *Plagiopyla sp.* ou *Stentor sp.* sont absentes sur des galets et présentes sur les substrats artificiels (papier de verre dans cette étude). De telles variations existent également chez les flagellés (absence d'*Heteromita sp.* sur les galets) et les amibes (absence de *Nuclearia sp.*, de kystes d'*Acanthamoeba*, de *Naegleria* et d'*Hartmanella* par exemple). La diversité des protistes est également plus forte sur les substrats artificiels (Hunt & Parry, 1998, Risse-Buhl & Küsel, 2009).

Le rôle des ciliés sur la structure du biofilm ne s'arrête pas aux seules bactéries. En effet, lorsque la concentration des ciliés est forte, la concentration des flagellés hétérotrophes s'en trouve réduite. Ce phénomène n'engendre, par contre, aucun effet sur la concentration bactérienne dans les micro-colonies (Wey, *et al.*, 2008).

Le taux d'ingestion est important chez les ciliés (1254 bactérie/cilié/heure), il est beaucoup plus faible chez les flagellés (2-300 bactérie/flagellé/heure) tandis qu'il est le plus variable chez les amibes (0.2-1465 bactérie/amibe/heure). Du fait de leur concentration supérieure, les flagellés sont considérés comme le prédateur dominant des bactéries dans les systèmes aquatiques (Parry, 2004). Les différents groupes de protistes contribuent ainsi au transfert de carbone et d'énergie depuis le biofilm vers les niveaux trophiques supérieurs à travers leur pression de prédation sur les bactéries (Dopheide, *et al.*, 2011).

De leur côté, les bactéries peuvent répondre au broutage par les protistes en développant des structures et des mécanismes de résistance telles que la formation de micro-colonies, mais également en produisant des facteurs anti-protistes (certains acides aminés inhibent les ciliés). Les protistes modifient ainsi directement et indirectement la morphologie du biofilm (Parry, 2004, Dopheide, *et al.*, 2011).

Des relations autres que la prédation existent dans les biofilms naturels, c'est le cas des relations syntrophiques et commensales. Ces relations impliquent le transfert de métabolites entre les différents organismes, et peuvent donc dépendre des interactions qui gèrent la distribution spatiale des organismes (Nielsen, *et al.*, 2000, Chenier, *et al.*, 2006).

Ces interactions peuvent impliquer les organismes autotrophes et les hétérotrophes. Ainsi, les composés excrétés par les algues suite à la photosynthèse, ou par les bactéries autotrophes, sont ensuite utilisés par les bactéries hétérotrophes (Nielsen, *et al.*, 2000, Chenier, *et al.*, 2006).

Des relations commensales entre les bactéries sont également présentes et jouent un rôle déterminant dans la distribution spatiale des bactéries au sein des micro-colonies, qui contiennent à la fois des utilisateurs primaires et des utilisateurs secondaires des métabolites. Cette distribution est d'ailleurs permise grâce à la motilité bactérienne (Nielsen, *et al.*, 2000).

Le biofilm est donc une structure complexe. Bien que des morphotypes différents dominent les communautés en cas de vitesses contrastées, tous les groupes fonctionnels contribuent à la mise en place du biofilm et permettent l'apparition de tous les liens trophiques de la boucle microbienne (Risse-Buhl & Küsel, 2009). Ainsi, dans son ensemble, la communauté du biofilm est essentielle dans la production et la dégradation de la matière organique, mais aussi dans la dégradation de certains polluants environnementaux, ainsi que dans le cycle de l'azote et du soufre (Davey & O'Toole, 2000).

2.4.1.3 Composition de la matrice du biofilm

La composition de la matrice varie en fonction des espèces microbiennes, de leur état physiologique, des nutriments disponibles mais également des conditions environnementales dans lesquelles se développe le biofilm (Sutherland, 2001).

Elle est constituée à plus de 97% d'eau, mais aussi de polymères sécrétés par les bactéries elles-mêmes, de nutriments absorbés, de métabolites, de produits issus de la lyse cellulaire et même de déchets provenant de l'environnement immédiat du biofilm. Toutes les catégories de macromolécules y sont représentées. On retrouve des protéines, des polysaccharides, de l'ADN et des ARN, mais aussi du peptidoglycane, des lipides, des glycolipides, des phospholipides, des surfactants, des vésicules membranaires, et différentes espèces ioniques (Ca^{2+} par exemple) (Zobell, 1943, Sutherland, 2001, Karatan & Watnick, 2009). Après avoir longtemps considéré la matrice comme récalcitrante à la dégradation par les microorganismes, il semblerait, en fait, qu'elle soit en partie biodégradable (Battin, *et al.*, 1999, Zhang & Bishop, 2003, Parry, 2004).

Les exopolysaccharides (EPS) sont les composants principaux de la matrice de la plupart des biofilms. Ils peuvent représenter près de 80% des polysaccharides totaux du biofilm lorsque celui-ci est jeune, mais cette proportion diminue au cours de la colonisation du biofilm jusqu'à ne représenter plus que 36% des polysaccharides dans le cas d'un biofilm mature (Karatan & Watnick, 2009, Diaz Villanueva, *et al.*, 2011). La quantité d'exopolysaccharides dépend également de la vitesse d'écoulement : elle est significativement supérieure lors des écoulements les plus rapides (Battin, *et al.*, 2003).

Même si certains EPS sont communs, une multitude d'EPS peuvent être synthétisés par différentes espèces bactériennes. Ces EPS sont ensuite biodégradables, que ce soit par les producteurs eux-mêmes ou par d'autres organismes. Ils représentent alors un substrat enzymatique et sont utilisés plus rapidement que d'autres classes de molécules telles que les protéines (Zhang & Bishop, 2003). Ces molécules jouent un rôle important dans le développement du biofilm. En effet, en cas d'absence de synthèse et d'exportation d'EPS, les bactéries peuvent généralement adhérer à une surface, mais elles sont incapables de former un biofilm multicouche (Karatan & Watnick, 2009). La composition en EPS détermine également des propriétés importantes du biofilm, telles que sa solidité, son élasticité et sa capacité d'adsorption (Zhang & Bishop, 2003, Karatan & Watnick, 2009).

La matrice contient également des monosaccharides, principalement du glucose, mais aussi du galactose et du mannose lorsque le biofilm est jeune. Bien que les monomères majoritaires restent les mêmes, les concentrations en monosaccharides se modifient au cours du développement du biofilm en fonction des conditions environnementales. Dans le cas d'un cours d'eau lent, la concentration en glucose diminue tandis que celles en arabinose, rhamnose, galactose, mannose et xylose augmentent (Battin, *et al.*, 2003).

Le biofilm, à travers sa matrice, possède une activité enzymatique importante. Il s'agit principalement d'une activité leucine-aminopeptidase, et β -glucosidase. A l'inverse, l'activité β -glucosaminidase est la plus faible (Romani, *et al.*, 2008, Diaz Villanueva, *et al.*, 2011). La leucine-aminopeptidase est impliquée dans la décomposition des peptides, tandis que la β -glucosidase intervient dans l'étape finale de la décomposition de la cellulose et des polysaccharides et que la β -glucosaminidase permet la décomposition du peptidoglycane et de la chitine (Romani, *et al.*, 2008).

L'augmentation de l'activité enzymatique extra-cellulaire totale au cours de la formation du biofilm intervient suite à l'augmentation de la biomasse et des polysaccharides. Après 4 jours, l'activité des enzymes β -glucosidase et leu-aminopeptidase représente 65 à 81% de l'activité de l'ensemble des enzymes du biofilm puis leur importance diminue avec le développement du biofilm : dans un biofilm mature, elle ne représente plus que 13 à 37% de l'activité enzymatique totale. L'activité de la troisième enzyme (β -glucosaminidase) dans la matrice est faible, elle varie avec le temps mais semble-t-il, sans corrélation significative avec la biomasse (Romani, *et al.*, 2008).

Par sa composition, la matrice joue un rôle de tampon face aux changements de concentration en matière organique du milieu. Elle représente également une protection contre les UV, les changements de pH, les chocs osmotiques et la dessiccation (Flemming, 1993, Freeman & Lock, 1995).

2.4.1.4 Structure du biofilm

On distingue, tout d'abord, les biofilms dits monocouches lorsque les bactéries sont uniquement liées à la surface immergée, des biofilms multicouches lorsque les cellules bactériennes forment des amas et sont donc attachées à la fois à la surface et aux cellules adjacentes (Karatan & Watnick, 2009). Les premiers sont principalement rencontrés lors de culture pure de certaines souches bactériennes tandis que les derniers sont rencontrés dans les milieux naturels mais aussi lors de cultures. Les biofilms multicouches présentent une structure complexe.

L'évolution des techniques en microscopie (microscopie optique associée à la microscopie assistée par ordinateur, microscopie confocale à balayage laser...) a permis de mieux décrire la structure des biofilms (Figure 6) et ainsi de montrer qu'ils possèdent un arrangement spatial particulier constituant son architecture (Lawrence, *et al.*, 1991).

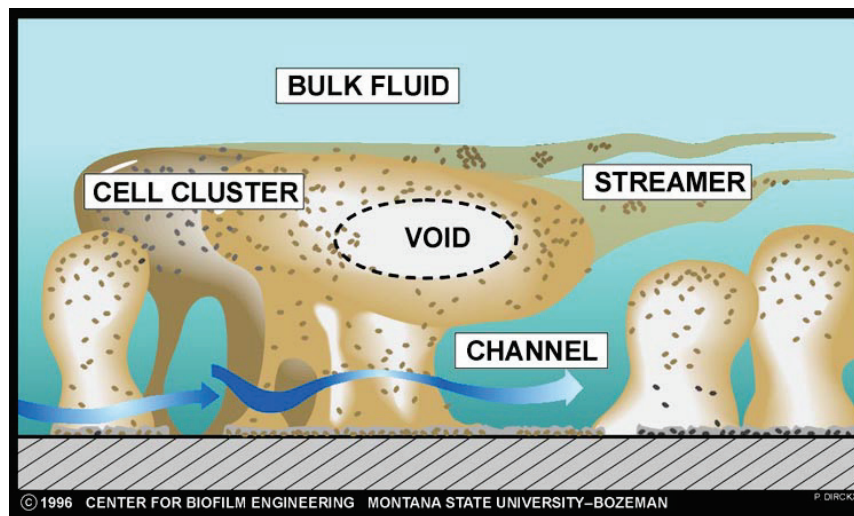


Figure 6: Représentation schématique de l'architecture d'un biofilm avec la présence d'amas cellulaires (cell cluster), des portions effilées de la masse qui rejoignent l'eau libre circulante et à partir desquelles se produisent des décrochages et un essaimage de cellules (streamers), mais aussi d'espaces ne contenant pas de bactéries (void). Les canaux (channel) permettent une circulation d'eau et de nutriments à travers la base du biofilm notamment (P. Dirckx, 1997).

Dans les biofilms environnementaux matures, les cellules sont généralement regroupées dans certaines zones de la matrice pour former des amas qui peuvent prendre la forme de colonnes mais aussi de "champignons". La distance entre les cellules est comprise entre 4 et 10 μm . Mais, même dans les amas, la répartition cellulaire n'est pas uniforme, formant alors des zones de vide (voids) où les cellules sont complètement absentes (Lazar, Moller, *et al.*, 1997, Costerton, 2007).

La matrice laisse la place à des espaces extra-cellulaires qui peuvent prendre la forme de canaux grâce auxquels un flux de liquide s'établit dans les parties les plus profondes du biofilm. Ce flux permet le transport de nutriments, d'enzymes, de métabolites, de déchets et d'autres solutés à travers le biofilm, toutes des conditions micro-environnementales qui vont permettre la maturation du biofilm. L'itinéraire du flux dépend de la forme des canaux, tandis que sa vitesse dépend des paramètres physico-chimiques tels que la structure locale ou l'importance des vides à l'intérieur du biofilm. Elle augmente progressivement depuis la base jusqu'à la partie supérieure du biofilm. Autour des amas, un flux à contre-courant peut parfois être observé. Ces canaux véhiculent les solutés dans les parties profondes du biofilm où les cellules peuvent ainsi continuer à être actives. Par contre, ils ne permettent pas le transport des solutés à l'intérieur des amas cellulaires. C'est le processus de diffusion qui s'en charge alors. Il se forme donc un gradient de concentrations des solutés à l'intérieur des amas cellulaires (Lawrence, *et al.*, 1991, Stoodley, *et al.*, 1994, Sutherland, 2001, Stoodley, *et al.*, 2002, Stewart, 2003). La présence des canaux peut aussi permettre le déplacement des protistes dans les parties plus profondes du biofilm (Parry, 2004).

Une structure tertiaire est parfois observée au sein des amas cellulaires dans les biofilms environnementaux : il s'agit d'une structure en nid d'abeille. Cette propriété se perd généralement dans le cas d'une culture monospécifique. Le rôle de cette structure n'a pas été déterminé, mais il est possible qu'elle soit impliquée dans le contrôle des variations des conditions environnementales (Costerton, 2007).

Les biofilms monospécifiques permettent d'observer la formation d'architectures spécifiques à certaines espèces. Les bactéries peuvent par exemple se situer plus ou moins profondément dans la matrice du biofilm. En effet, les biofilms à *Pseudomonas* présentent une plus forte densité cellulaire à la surface du biofilm, tandis que les biofilms à *Vibrio parahaemolyticus* ont une plus forte densité de cellules à proximité du substrat. Ces biofilms présentent également plus de canaux et de pores c'est-à-dire de zone où les bactéries sont absentes (Lawrence, *et al.*, 1991).

Dans des biofilms monospécifiques d'*E.coli*, les cellules sont connectées entre elles par de multiples pili impliqués à la fois dans les processus de conjugaison mais aussi dans des mécanismes de localisation. Ces pili peuvent donc être responsables de la position des cellules au sein des biofilms monospécifiques (Costerton, 2007).

L'estimation du développement d'un biofilm peut s'effectuer soit à travers la mesure de la surface colonisée, soit à travers la mesure de l'épaisseur du biofilm. D'une manière générale, l'épaisseur du biofilm varie avec son âge et en fonction de l'hydrodynamisme environnant. En mésocosme, des biofilms âgés d'une semaine font $30 \pm 17 \mu\text{m}$ tandis que des biofilms matures atteignent $200 \pm 58 \mu\text{m}$ (Stoodley, *et al.*, 1999, Augspurger, *et al.*, 2010).

Ils peuvent également être caractérisés par leur porosité, c'est-à-dire par la portion d'une section de biofilm qui est occupée par de l'eau, sans tenir compte de l'eau intra-cellulaire des organismes du biofilm. Cette porosité passe de 84-93% en surface du biofilm à 58-67% dans les couches profondes. A l'inverse, le diamètre moyen des pores du biofilm diminue de $1.7\text{-}2.7 \mu\text{m}$ à $0.3\text{-}0.4 \mu\text{m}$ (Zhang & Bishop, 1994).

Une structure supplémentaire est observée sur les biofilms matures développés uniquement dans des conditions turbulentes. Il s'agit de "streamers" qui forment une sorte de faisceau à l'extrémité des amas cellulaires (Figure 6) (Stoodley, *et al.*, 1999, Augspurger, *et al.*, 2010). Ces streamers sont définis comme des structures complexes, d'apparence filamenteuse, fixées sur la face aval d'un amas de cellules et dont la pointe est elle-même dirigée vers l'aval. Leur formation provient uniquement de la division cellulaire en présence d'importantes forces de cisaillement. Ces forces ont pour effet de positionner les cellules filles vers l'aval, de manière à former une sorte de filament (Lewandowski & Stoodley, 1995, Stoodley, *et al.*, 1998).

Les "streamers" oscillent dans la colonne d'eau avec une amplitude qui dépend de l'hydrodynamisme dans le cas des vitesses les plus lentes, et des propriétés des matériaux du biofilm dans le cas des vitesses les plus rapides. Cette amplitude d'oscillation est limitée par la flexibilité du streamer (Stoodley, *et al.*, 1998). L'augmentation de la vitesse d'écoulement au contact du biofilm (dans une gamme comprise entre 2.4 et 50.5 cm/s) est responsable de l'arrachage de fragments du biofilm. Le détachement de cellules peut alors s'effectuer à deux niveaux (Stoodley, *et al.*, 1998) :

- au niveau d'un amas de cellules : il reste alors une fine couche de biofilm sur le substrat, montrant que les liaisons entre le substrat et la base du biofilm sont plus solides que les liaisons internes au biofilm.
- au niveau d'un "streamer" : la rupture du streamer peut se faire à proximité de l'amas cellulaire ou plus loin sur le streamer lui-même.

En raison de leurs oscillations dans le courant, ces structures peuvent jouer un rôle dans le recrutement de nouvelles cellules bactériennes (Augspurger, *et al.*, 2010).

D'une manière générale, l'architecture du biofilm est éphémère : il est souvent élastique et l'ensemble des composants répondent aux différents stress présents. Ainsi, l'architecture visible à un moment donné est le résultat d'une séquence de développement modifiée par les forces de cisaillement. De plus, les relations spatiales entre les cellules dans la matrice semblent dépendre des nutriments présents (Costerton, 2007).

2.4.1.4.1 Le biofilm : une structure hétérogène

Le biofilm est une structure spatialement hétérogène, à la fois sur un plan chimique et biologique (Characklis & Marshall, 1990, Stewart & Franklin, 2008).

2.4.1.4.1.1 Hétérogénéité chimique

Comme cela a été évoqué précédemment, le transport des solutés à l'intérieur des amas cellulaires s'effectue principalement grâce au processus de diffusion. Les limites de la diffusion sont responsables de la mise en place de différents gradients de concentration des solutés. Ces gradients concernent donc les substrats du métabolisme des microorganismes mais aussi leurs produits. Le temps nécessaire à l'équilibre d'un soluté dans un biofilm peut durer entre une fraction de seconde et une dizaine de minutes (Stewart, 2003, Stewart & Franklin, 2008). Trois paramètres permettent alors de déterminer la distribution des solutés dans le biofilm : leur production, leur consommation et leur diffusion (Stewart & Franklin, 2008).

Le gradient de concentration en oxygène est le plus étudié, il diffère selon les biofilms et le type de milieu dans lequel se développe le biofilm.

En rivière, milieu contenant de l'oxygène, des bactéries aérobies sont à l'origine du biofilm. Lorsque l'oxygène pénètre dans le biofilm, il est rapidement consommé par les bactéries situées à proximité de l'interface eau-biofilm. La concentration en oxygène diminue donc à mesure que l'on se rapproche du substrat : il peut même se former une zone anoxique dans les parties profondes du biofilm (à une distance allant de 175 à 200 μm de la surface du biofilm). À l'inverse, les produits du métabolisme sont plus concentrés dans les zones profondes du biofilm et peuvent même être absents des zones proches de l'interface eau-biofilm. Certains produits servent de substrat à d'autres organismes, ils peuvent alors se concentrer dans les zones plus intermédiaires des biofilms (Stewart & Franklin, 2008).

Le gradient en oxygène est responsable de la répartition bactérienne. Les bactéries aérobies consomment l'oxygène dans les zones de surface alors que dans les zones plus profondes, on trouve principalement des bactéries anaérobies, comme les sulfato-réductrices qui produisent du sulfure d'hydrogène à partir des sulfates. Ces types bactériens ne se limitent tout de même pas à ces zones, leur état physiologique peut être modifié en dehors de leur zone optimale (Stewart and Franklin 2008).

Dans le cas des biofilms contenant des organismes phototrophes, le CO₂ de l'eau est transporté par diffusion à l'intérieur du biofilm où il est ensuite réduit par les phototrophes en présence de lumière. L'utilisation des exsudats a ensuite lieu à la fois pendant des périodes lumineuses et pendant les périodes obscures. Au cours des périodes obscures, la production par les organismes photosynthétiques diminue et les bactéries hétérotrophes utilisent préférentiellement les produits algaux excrétés dans le biofilm. Mais, si la concentration des exsudats est insuffisante les bactéries hétérotrophes peuvent alors utiliser les produits algaux présents dans la colonne d'eau. Lorsque les excréta algaux ne sont pas utilisés par la population bactérienne, ils sont transportés dans le biofilm pour être relargués dans la colonne d'eau. Les produits synthétisés par les algues représentent donc les ressources nutritives principales pour les bactéries hétérotrophes du biofilm (Haack & McFeters, 1982).

2.4.1.4.1.2 Hétérogénéité biologique

L'hétérogénéité chimique du biofilm est responsable de l'hétérogénéité physiologique des bactéries présentes dans le biofilm. En effet, lorsque des bactéries intègrent un biofilm, elles se différencient physiologiquement par rapport aux bactéries planctoniques. Les modifications de l'état physiologique varient selon les bactéries et en fonction de leur position dans le biofilm. Elles peuvent correspondre à un simple ralentissement de la croissance (Zhang & Bishop, 1994, Stewart, 2003, Stewart & Franklin, 2008, Ylla, *et al.*, 2009, Diaz Villanueva, *et al.*, 2011).

Les bactéries dont l'activité et la croissance sont les plus faibles se situent dans les zones caractérisées par une limitation importante des substrats métaboliques. A leur mort, les bactéries situées dans les parties profondes du biofilm ou au centre des amas cellulaires restent dans la matrice. Ainsi, la proportion de cellules viables est comprise entre 72 et 91% à la surface du biofilm et diminue à 31-39% dans les couches profondes du biofilm. Cette proportion évolue également dans le temps : après 14 jours de développement du biofilm, 50% des bactéries présentent des dommages au niveau de leurs membranes et sont donc mortes (Zhang & Bishop, 1994, Stewart, 2003, Stewart & Franklin, 2008, Ylla, *et al.*, 2009, Diaz Villanueva, *et al.*, 2011).

Le développement bactérien est lui-même responsable des modifications du microenvironnement du biofilm, la communauté bactérienne doit ensuite s'adapter aux modifications qu'elle a elle-même engendrées. Ainsi, l'assemblage bactérien subit une modification fonctionnelle parallèlement à la dégradation des sucres simples et des glucides lors des premières semaines de développement. La communauté devient ensuite capable d'utiliser une plus grande variété de source de carbone, c'est le cas de dérivés de polymères aromatiques (Jackson, *et al.*, 2001).

2.4.2 Cycle de développement des biofilms

Le développement du biofilm est le résultat net des différents processus de nature physique, chimique et biologique (Characklis, 1981). La cinétique de son développement est décrit par une sigmoïde dont le point d'inflexion correspond à la valeur maximale du taux net de développement du biofilm (Figure 7).

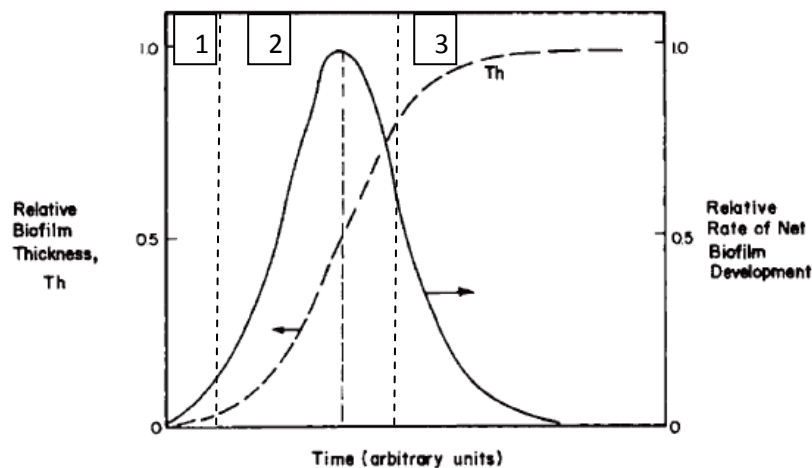


Figure 7 : Développement du biofilm dans le temps
ligne pointillée : épaisseur ; ligne continue : taux net de développement
1 : phase de latence ; 2 : phase de croissance ; 3 : phase de maturation
(D'après (Characklis, 1981))

Trois phases principales sont alors définies (Characklis, 1981, Belkhadir, *et al.*, 1988, Van Loosdrecht, *et al.*, 1990, Stanley & Lazazzera, 2004) :

- Une phase de latence à laquelle correspond un conditionnement de la surface, c'est-à-dire un transport et de l'adsorption de molécules organiques sur le substrat ; c'est également durant cette phase que se font les arrivées de bactéries depuis l'eau libre et leur accrochage sur la surface conditionnée.
- Une phase de croissance du biofilm au cours de laquelle la biomasse fixée s'accumule, une quantité importante de polysaccharides est produite. Elle mène à la colonisation de l'ensemble de la surface à travers deux phases, une phase de croissance accélérée et une phase de croissance linéaire.
- Une phase de stabilisation du biofilm. Le biofilm est alors considéré comme mature. Cette phase se traduit par un ralentissement de la croissance du biofilm qui compense tout de même l'érosion que le biofilm subit en permanence du fait des forces de cisaillement. Il se stabilise donc au niveau d'un plateau. C'est durant cette phase également que se produisent des décrochages de cellules dans le cadre de processus d'essaimage "actifs" liés, par exemple, à la dégradation des conditions générales de développement du biofilm.

La formation du biofilm requiert une certaine coordination entre les différentes espèces bactériennes, et fait donc intervenir des interactions et une communication entre elles (Davey & O'Toole, 2000).

2.4.2.1 La phase de latence

La phase de latence est caractérisée par le conditionnement de la surface immergée, c'est-à-dire par le transport et l'adhésion de molécules organiques, puis des premières bactéries qui colonisent ce substrat. L'adsorption de molécules organiques à la surface du substrat, généralement des polysaccharides ou des glycoprotéines, a lieu en quelques minutes seulement et modifie les propriétés de la surface immergée. Ce film organique influence ensuite les successions microbiennes du biofilm. (Belkhadir, Capdeville et al. 1988).

Le transport des particules dépend généralement de type d'écoulement et peut s'effectuer très rapidement. Lorsque des particules en suspension dans l'eau libre sont amenées près de la surface, le transport aléatoire diminue tandis que l'influence de la couche limite (couche dans laquelle la vitesse de circulation est nulle) augmente. Lorsque des particules sont entrées dans la couche limite, elles rejoignent généralement la surface par sédimentation ou du fait de forces d'attraction de diverses natures. Ce transfert de molécules et de bactéries jusqu'au substrat peut faire appel à 3 mécanismes principaux :

- Un transport passif par un flux de gaz ou de liquide ;
- Un transport lié à la combinaison de forces de diffusion et de mouvements browniens ;
- Un mouvement actif faisant intervenir un ou plusieurs flagelles.

Les matières solubles et les petites particules sont également soumises au processus de diffusion pour rejoindre le substrat.

Les bactéries se fixent individuellement ou par groupes sur la surface conditionnée (Karatan & Watnick, 2009). Cette fixation se fait en deux étapes : une adhésion réversible suivie par une adhésion irréversible.

La phase réversible correspond à une adhésion initialement faible de la cellule qui peut continuer à avoir un mouvement brownien et qui peut encore se détacher du fait de changements de l'hydrodynamique. Les forces d'adhésion intervenant dans cette phase réversible peuvent être des forces électrostatiques, des forces de Van der Waals, une tension interfaciale ou une liaison covalente. Un grand nombre de cellules qui adhèrent ainsi au substrat quittent cette surface après quelques secondes ou minutes.

La phase irréversible a lieu avec la production de polymères extra-cellulaires (polysaccharides et glycoprotéines). Seuls des traitements mécaniques importants conduisent alors au décrochage de cellules (Characklis, 1981, Costerton, 2007).

Immédiatement après leur attachement au substrat, les bactéries peuvent effectuer différentes "manœuvres" de colonisation. Quatre types de mouvements ont été définis en fonction du comportement de la cellule fille après division cellulaire, deux d'entre eux conduisent à la formation de micro-colonies (Lawrence & Caldwell, 1987) :

- Dans le mouvement de type "packing", après la division cellulaire, les cellules filles se déplacent latéralement les unes par rapport aux autres et se positionnent parallèlement dans un même plan. L'espace entre les cellules qui en résulte, n'est généralement pas supérieur à la largeur d'une cellule. Ce mouvement permet la formation de colonies compactes et dendritique (Lawrence & Caldwell, 1987).
- Lors du mouvement de type "spreading", les cellules filles se déplacent continuellement après la division cellulaire. Elles se retrouvent ainsi à 5-20 μm les unes des autres et peuvent former autant de colonies (Lawrence & Caldwell, 1987).

- Dans le mouvement de "shedding", la cellule primaire se fixe à la surface et sa "progéniture" émigre depuis la surface. Les cellules filles sont ainsi exclues du biofilm au fur et à mesure de leur apparition. Il ne se forme donc pas de colonie (Lawrence & Caldwell, 1987).
- Lors du dernier mouvement, dit de "rolling", les cellules maintiennent leur association intime avec la surface, mais elles ne restent pas stationnaires et ne forment pas de micro-colonies. Les cellules roulent en effet sur la surface simultanément à leur croissance et à leur division. Les cellules semblent emmêlées en raison de leurs mouvements. Ce type de mouvement est plus lent que lorsque la bactérie se déplace à l'aide de ses flagelles (Lawrence & Caldwell, 1987).

La nomenclature associée à ces mouvements a été définie dans le contexte d'un flux laminaire de l'eau. L'arrêt du flux se traduit par la dispersion des colonies obtenues par le mouvement de packing, mais pas de celles formées par le mouvement de spreading. Aucun effet n'est observé dans le cas des deux autres types de déplacement. Une croissance exponentielle est observée au sein des micro-colonies formées par les mouvements de packing et de spreading, mais pas sur les cellules subissant les deux autres mouvements (Lawrence & Caldwell, 1987).

Ces mouvements de colonisation peuvent être caractéristiques d'une espèce et donc être utilisés comme critères taxonomiques. En effet, *P. fluorescens* utilise uniquement le mouvement de packing (Lawrence & Caldwell, 1987). Dans le cas de *P. aeruginosa*, la formation d'un biofilm monospécifique met en jeu 2 types de cellules : celles dites émigrantes, beaucoup plus dynamiques que les autres qui restent quasiment immobiles. Par ailleurs, chez cette espèce, le développement des micro-colonies résulte essentiellement du phénomène de recrutement et semble peu lié à la division cellulaire (Rice, *et al.*, 2003).

Ces cellules accrochées à la surface d'un support peuvent aussi se déplacer et former des agrégats par le mécanisme de "twitching" grâce à leurs pili de type IV. L'observation de biofilms monospécifiques montre que ce type de mouvement peut être spécifique. Certaines espèces forment des agrégats circulaires, tandis que chez d'autres espèces les cellules restent séparées les unes des autres (Costerton, 2007). Le mouvement dépendant des pili de type IV, voit son efficacité varier en fonction des conditions hydrodynamiques. En effet, des forces de cisaillement trop importantes limitent le phénomène de twitching. Les micro-colonies formées résultent donc plutôt de la division cellulaire et donc des mouvements définis par Lawrence et Cadwell. Par contre, en conditions statiques ou en présence d'un flux lent ou intermittent, les pili de type IV permettent bien une mobilité des cellules présentes sur le substrat et donc l'initiation de la formation des micro-colonies (De Kievit, *et al.*, 2001).

Chez *P. aeruginosa*, le flagelle est important dans la formation du biofilm puisque c'est par son intermédiaire que se fait l'adhérence à une surface abiotique et la formation d'une monocouche (Figure 8). Les pili de type IV interviennent ensuite dans la formation des micro-colonies par le mouvement de "twitching". Il est possible que les pili jouent aussi un rôle en stabilisant les interactions avec la surface abiotique, et dans les interactions entre cellules menant à la formation des micro-colonies (O'Toole & Kolter, 1998).

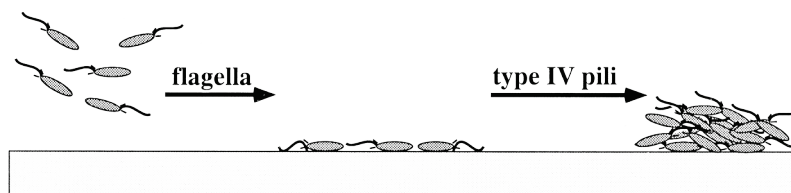


Figure 8: Rôle du flagelle et des pili de type IV lors de la formation des biofilms à *P. aeruginosa* (O'Toole & Kolter, 1998).

Il a été montré dans le cas des biofilms à *P. aeruginosa*, que de l'ADN extra-cellulaire est nécessaire à leur établissement et à leur maintien, il aurait même un rôle fonctionnel dans le biofilm en jouant un rôle dans la connexion entre les cellules. Il a également été retrouvé dans les biofilms à *S. intermedius*, *S. mutans*, *E. faecalis* et les *Staphylococcus*. Il stabiliserait le biofilm chez *S. aureus*. Cet ADN se trouve dans la matrice du biofilm, et provient probablement de vésicules membranaires plutôt que de cellules lysées. Dans les biofilms matures, la matrice peut contenir d'autres substances ou produire suffisamment d'exo-enzymes pour inactiver localement les DNases et permettre le maintien d'ADN malgré leur présence (Whitchurch, *et al.*, 2002, Yang, *et al.*, 2007, Montanaro, *et al.*, 2011).

D'autres composants cellulaires sont importants au cours de cette étape d'initiation de la formation du biofilm. C'est le cas des LPS, composant principaux des membranes externes des bactéries, qui jouent un rôle dans l'attachement initial des bactéries (Davey & O'Toole, 2000). C'est le cas aussi des adhésines qui sont responsables de la reconnaissance de la surface sur laquelle s'effectue l'adhésion et interviennent dans l'attachement en lui-même à travers des liaisons de type hydrophobes, hydrogènes, ioniques et covalentes (Nikolaev & Plakunov, 2007).

L'association initiale avec la surface mène à d'importantes modifications au sein de la cellule. Plusieurs gènes réagissent à l'arrivée de la bactérie sur un support (phase d'attachement réversible) et sont à l'origine, notamment, de la production d'EPS qui donnera son caractère irréversible à l'accrochage. A partir de ce stade, le nombre des gènes actifs augmente considérablement. De ce fait, les cellules d'un biofilm diffèrent beaucoup, sur le plan moléculaire, des cellules planctoniques. On estime entre 20 et 70% les différences en termes de groupes de gènes exprimés, lorsqu'elles se développent dans une communauté entourée d'une matrice associée à une surface ou à une interface (Costerton, 2007, Nikolaev & Plakunov, 2007).

Le processus permettant l'attachement initial des bactéries à un substrat dépend bien évidemment de l'espèce bactérienne ainsi que du type de substrat (nutritif/non nutritif) et de sa nature. Par exemple, le cuivre peut inhiber l'attachement cellulaire à travers l'inhibition de processus métaboliques nécessaires pour cette étape. Les cations (Ca^{2+} , Mg^{2+} et Fe^{3+}) influencent également la phase d'attachement en altérant certaines caractéristiques de surface du substrat mais aussi en formant des ponts entre les électrolytes anioniques cellulaires et les électrolytes anioniques du substrat immergé. D'autres signaux environnementaux peuvent influencer cette étape de la formation du biofilm. C'est le cas de l'osmolarité, du pH, de la concentration en fer, de la pression partielle en oxygène et de la température (Characklis, 1981, Davey & O'Toole, 2000).

2.4.2.2 La phase de croissance du biofilm

Au cours de la croissance du biofilm, son architecture se modifie. En effet, lors des premiers stades de colonisation, on observe la formation de micro-colonies distinctes qui vont ensuite se développer pour former un biofilm d'apparence relativement uniforme. Il existe donc une redistribution des cellules au cours du développement du biofilm (Henrici, 1933, Characklis, 1981, Lawrence, *et al.*, 1991).

Le développement du biofilm dépend de son approvisionnement à la fois pour les éléments qui le constituent (microorganismes) et pour les nutriments (oxygène, carbone dissous et particulaire, oligoéléments). Généralement, dans les biofilms d'eau douce, la biomasse (C et N) augmente fortement durant la première semaine de développement. Elle est suivie par une plus faible augmentation entre les jours 14 et 30. La biomasse se stabilise à partir des jours 42 à 49. Les concentrations des polysaccharides totaux et extra-cellulaires suivent la même tendance (Pedersen, 1982, Romani, *et al.*, 2008).

En fait, l'augmentation rapide de la concentration bactérienne des espèces pionnières peut s'expliquer de deux manières :

- la croissance des bactéries qui viennent de se fixer s'accélère après leur adhésion au support,
- l'apport continu de nouvelles cellules en provenance de la communauté planctonique de l'eau libre (Pohlon, *et al.*, 2010).

Au cours de la croissance des micro-colonies, les parties supérieures peuvent se rejoindre, entraînant la formation de zones vides au sein de la couche basale du biofilm. Il s'agit de l'un des mécanismes conduisant à la formation des canaux (Battin, *et al.*, 2003).

L'activité enzymatique extra-cellulaire augmente aussi au cours du développement du biofilm. Dès la phase de colonisation initiale, les organismes pionniers libèrent, dans la matrice, une quantité importante d'enzymes : les enzymes apparaissent dans la matrice et sont actives dès la 4^{ème} heure de développement pour l'alkaline phosphatase et à partir de la 8^{ème} heure pour la β -glucosidase. Une autre enzyme, la β -xylosidase, est détectée encore plus tardivement, seulement après 7 jours de développement. Puis, tout au long du développement du biofilm, les concentrations de ces trois enzymes augmentent au sein de la matrice d'un facteur 7, 11 et 16 respectivement. La population bactérienne est donc très active dès les premiers stades de développement du biofilm (Pohlon, *et al.*, 2010). La lyse cellulaire est également un mécanisme important dans la libération d'enzymes. Malgré une certaine baisse de la concentration des enzymes dans les biofilms matures, elle semble tout de même se maintenir au-dessus d'un certain niveau donnant ainsi à la matrice un rôle de réservoir d'enzymes extra-cellulaires (Romani, *et al.*, 2008, Pohlon, *et al.*, 2010, Diaz Villanueva, *et al.*, 2011).

La communication entre les cellules est importante pour le développement du biofilm et son fonctionnement: elle s'effectue à travers le phénomène de "quorum sensing" (Davies, *et al.*, 1998, Kolter & Losick, 1998, Nikolaev & Plakunov, 2007). Cette communication a été initialement observée dans les biofilms à *P. aeruginosa* (Davies, *et al.*, 1998, Kolter & Losick, 1998) et s'effectue grâce à une molécule signal du type homosérine lactone acylée (HSL). Les HSL sont produites dans les biofilms aquatiques naturels, soit par l'ensemble des bactéries du biofilm, soit uniquement par certaines espèces. Dans les milieux naturels, différentes HSL sont produites au sein d'un seul biofilm. Les HSL contrôlent de nombreux phénomènes tels que la bioluminescence (chez certaines espèces), la synthèse d'exoenzymes, ou la production de facteurs de virulence. Comme de nombreux peptides, elles sont sécrétées par les bactéries et s'accumulent dans le milieu proportionnellement au nombre total de cellules et fournissent ainsi une indication de la densité de population. D'où leur nom de quorum sensors ou d'auto-inducteurs. Plusieurs d'entre elles sont des molécules signal clé dans le développement de l'architecture du biofilm de *P. aeruginosa* (McLean, *et al.*, 1997, Davies, *et al.*, 1998, Kolter & Losick, 1998, De Kievit, *et al.*, 2001).

Le système du "quorum sensing" utilise une protéine d'activation transcriptionnelle qui agit de concert avec une petite molécule signal auto-inductrice pour stimuler l'expression de gènes cibles. L'augmentation de la concentration de l'auto-inducteur est proportionnelle à celle du nombre de cellules, il permet donc un suivi de la densité de population. Au-dessus d'une concentration seuil, l'auto-inducteur se lie à l'activateur de la transcription, lui permettant d'induire l'expression des gènes cibles (McLean, *et al.*, 1997, De Kievit, *et al.*, 2001, Kimura, *et al.*, 2009). Ce système permet donc de réguler de manière synchrone l'expression d'un grand nombre de gènes dans une population bactérienne. Les bactéries Gram- utilisent des molécules à base de lipides (des acylhomosérines lactones, HSL) pour communiquer entre elles, tandis que les bactéries Gram+ utilisent des molécules à base de peptides (les peptides auto-inducteurs). Parmi les gènes contrôlés par ces systèmes, certains coordonnent le comportement de la population bactérienne, dont l'expression de facteurs de virulence ou l'induction de l'apoptose d'une cellule hôte (Kimura, *et al.*, 2009).

Deux systèmes de "quorum sensing" sont impliqués dans les premiers stades de développement du biofilm chez *Pseudomonas*, c'est-à-dire au cours de l'attachement et de la formation des micro-colonies (De Kievit, *et al.*, 2001).

Chez *P. aeruginosa*, un autre système, le système *las* impliquant la N-(3-oxododecanoyl)-L-homosérine lactone en tant qu'auto-inducteur ne joue pas seulement un rôle dans la communication entre les individus de l'espèce, mais également dans les interactions entre espèces et entre genres bactériens (Kimura, *et al.*, 2009). Il est important dans le développement d'un biofilm différencié, et n'est pas impliqué dans les étapes d'attachement initial et dans les différentes phases de croissance du biofilm (Davies, *et al.*, 1998, De Kievit, *et al.*, 2001).

2.4.2.3 La phase de stabilisation, de maturation du biofilm

La dernière phase de développement du biofilm est la phase de maturation au cours de laquelle, la biomasse se stabilise. Le biofilm a acquis son architecture. Cette phase de développement est caractérisée par le décrochage de cellules ou de fragments plus importants (Pedersen, 1982), bien que le décrochage des cellules semble pouvoir se produire à n'importe quel stade de développement du biofilm (Costerton, 2007).

La durée nécessaire à l'obtention d'un biofilm mature, ou dans un état proche de la maturité, est très variable selon le cours d'eau considéré. Certains auteurs pensent que cet état est obtenu en moins de 14 jours, mais cela peut aller jusqu'à un mois en fonction des conditions environnementales (Hunt & Parry, 1998, Stoodley, *et al.*, 1999, Lear, *et al.*, 2008). D'autres auteurs estiment que 3 à 5 mois peuvent être nécessaires à l'obtention de cet état (Jackson, *et al.*, 2001, Kathol, *et al.*, 2009, Pohlen, *et al.*, 2010). Si l'on s'intéresse uniquement aux ciliés présents dans le biofilm, seuls 14 jours semblent nécessaire à la stabilisation de leur concentration (Norf, *et al.*, 2007).

La masse totale du biofilm est déterminée par la balance entre les processus d'attachement, de croissance et de détachement (Hunt, *et al.*, 2004). Les fragments arrachés participent à l'extension de la distribution des bactéries le long du système et/ou à la recolonisation des tronçons qui ont pu être précédemment décapés (Stewart, 1993, Hunt, *et al.*, 2004).

De nombreux facteurs ont été évoqués comme étant important pour le décrochage du biofilm. Parmi eux, la production d'enzymes dégradant la matrice, la formation de bulles de gaz par les microorganismes, la concentration en nutriments, la phase de croissance des microorganismes, les forces de cisaillement, l'abrasion par des particules de la colonne d'eau, les signaux de quorum sensing, l'activation d'un bactériophage lytique (Stewart, 1993, Hunt, *et al.*, 2004). Chez certaines espèces, comme *Vibrio cholerae*, les EPS des membranes externes bactériennes semblent importantes dans le développement du biofilm mature en stabilisant les interactions entre les bactéries et le support (Davey & O'Toole, 2000).

Dans les faits, les causes et/ou les mécanismes mis en jeu sont probablement à chaque fois multiples et dépendants de la finalité du phénomène : création et maintien des canaux, dissémination "active" des organismes suite à des changements des caractéristiques de l'environnement, arrachage "passif" du fait de l'augmentation des forces de cisaillement.

Dans le détail, cinq types de détachement ont été définis par Bryers : l'érosion, le "sloughing" ou détachement de fragments, l'intervention humaine, le broutage par les prédateurs et l'abrasion (Stewart, 1993). L'érosion est un détachement continu de cellules individuelles ou de petites portions du biofilm, tandis que le "sloughing" est une perte rapide et massive de cellules (Characklis & Marshall, 1990, Stewart, 1993). L'érosion et le "sloughing" sont le résultat de la combinaison de processus internes au biofilm, des forces de cisaillements et des forces exercées par un liquide en mouvement en contact avec la surface du biofilm (Characklis, 1981). Les autres processus (intervention humaine, broutage par les prédateurs et abrasion), sont clairement le résultat de forces externes uniquement (Stewart, 1993).

Lors du phénomène de "sloughing", les cellules présentes dans les fragments de biofilm gardent un phénotype spécifique au biofilm. Le départ individuel de bactéries appartenant au biofilm pour devenir des cellules planctoniques est, par contre, plus complexe, car les cellules sessiles doivent retrouver leur phénotype planctonique et se libérer des différents composants de la matrice avant de quitter la communauté. Ce processus inclut un signal conduisant, d'une part, à la synthèse et à la libération d'enzymes capables de dégrader les polymères de base constituant la matrice du biofilm, et d'autre part, à la conversion des cellules vers leur phénotype planctonique (Costerton, 2007). D'une manière générale, la fréquence de détachement des fragments est inversement proportionnelle à la taille des amas de cellules. Par comparaison aux petits amas, la fréquence de décrochage des gros amas est plus faible, mais du fait de leur forte concentration en bactéries, la proportion de biomasse qui se détache avec eux est plus importante (Stoodley, *et al.*, 2001).

Les forces de cisaillement sont un facteur environnemental important dans les phénomènes d'érosion et de "sloughing". Le taux de détachement augmente avec l'augmentation des forces de cisaillement. De plus, le stress provoqué par les forces de cisaillement augmente généralement avec l'augmentation de l'épaisseur du biofilm : le taux de détachement du biofilm augmente avec l'augmentation de la masse du biofilm (Characklis, 1981). Les processus d'érosion et de "sloughing" conduisent à un état de stabilité de presque tous les biofilms, état pour lequel le taux de détachement est égal au taux de synthèse (Stewart, 1993).

Parmi les composés sécrétés par les bactéries du biofilm, certains peuvent être responsables de décrochage de fragments du biofilm. C'est le cas de certains acides aminés. Comme de nombreuses bactéries *Bacillus subtilis* produit des D-acides aminés lorsqu'elle se trouve en phase stationnaire de croissance. Quatre d'entre eux sont importants dans le cas des biofilms. En effet, la D-tyrosine, la D-leucine, le D-tryptophane et la D-méthionine inhibent la formation des biofilms, contrairement aux énantiomères L ou à d'autres acides aminés. Ces 4 acides aminés sont également responsables du décrochage de biofilms existants. Ils remplacent alors la D-adénine terminale dans les chaînes peptidiques du peptidoglycane modifiant la membrane cellulaire. Cette modification au niveau de la membrane bactérienne induit ensuite le décrochage de la cellule. Le mécanisme plus précis n'est pas connu pour l'instant (Kolodkin-Gal, *et al.*, 2010). Des molécules du quorum sensing peuvent également être impliquées dans cette étape, comme c'est le cas chez *P. aeruginosa* (Davies, *et al.*, 1998).

L'activité des bactériophages mène à la lyse de cellules au sein du biofilm. Cette lyse tout comme la mort cellulaire fournit des nutriments aux cellules restantes et participe à la formation de canaux et de cavités et donc à la structuration du biofilm (Nikolaev & Plakunov, 2007).

C'est le cas également de l'action de prédation de la bactérie *Bdellovibrio bacteriovorus*. Cette bactérie se nourrit d'une grande variété de proies appartenant aux bactéries Gram- uniquement. Sur des biofilms monospécifiques d'*E. coli*, son action dépend des conditions de la culture. En milieu pauvre, elle est capable de détruire complètement le biofilm, tandis que dans les milieux riches, elle diminue le développement et donc l'extension du biofilm. Dans le cas de communautés naturelles, il est possible qu'elle modifie la composition du biofilm en changeant l'importance relative des différentes populations bactériennes (Nunez, *et al.*, 2005).

De cette communauté sessile peuvent donc se détacher des fragments de biofilms mais également des bactéries qui retournent à un état planctonique (nageantes ou flottantes). Les communications entre le biofilm et le compartiment liquide sont importantes tout au long de son développement. Les biofilms sont des structures ouvertes, dans lesquelles peuvent pénétrer à la fois des cellules eucaryotes et des cellules procaryotes. C'est donc aussi le cas lors de la phase de maturation, mais les cellules importées sont alors confrontées à une communauté fonctionnelle qui est donc résistante à l'entrée et à l'intégration d'organismes extérieurs. Le recrutement de cellules est facilité dans le cas de communautés stressées comme dans celui de carences nutritives (Costerton, 2007).

2.4.2.4 Succession des organismes au cours du développement du biofilm

Les bactéries sont les organismes pionniers du développement du biofilm. A travers leur activité, elles sont à l'origine de la matrice du biofilm, et favorisent alors la fixation des autres organismes (Zobell, 1943, Liu, *et al.*, 1993). Un grand nombre d'espèces participent à cette phase de colonisation, mais elles appartiennent principalement au groupe *Cytophaga-Flavobacteria* (Jackson, *et al.*, 2001, Pohlen, *et al.*, 2010).

La diversité bactérienne évolue au cours du développement du biofilm (Jackson, *et al.*, 2001, Besemer, *et al.*, 2007). Le nombre d'espèces augmente jusqu'à un maximum au cours des 7 premiers jours. Par la suite la diversité diminue. Certaines espèces peuvent tout de même être présentes tout au long du développement (Jackson, *et al.*, 2001).

Les β -protéobactéries dominent la population bactérienne durant la phase initiale du développement. Puis on observe une augmentation rapide des bactéries appartenant aux α -protéobactéries et au groupe *Cytophaga-Flavobacterium*. Dans les biofilms matures, les bactéries appartenant aux α -protéobactéries et au groupe *Cytophaga-Flavobacterium* continuent de dominer. Les β -protéobactéries constituent le groupe morphologiquement le plus divers du biofilm. Le groupe bactérien le plus lent pour coloniser un biofilm est le groupe des γ -protéobactéries. La présence de bactéries sulfato-réductrices affiliées aux familles *Desulfovibrionaceae* et *Desulfobacteriaceae* confirme le fort potentiel métabolique des biofilms en milieu lotique (Manz, *et al.*, 1999, Pohlen, *et al.*, 2010). Les algues, majoritairement des diatomées, apparaissent également rapidement, après les 7 premiers jours de développement (Pohlen, *et al.*, 2010). Au cours du processus de maturation du biofilm, les espèces présentes dans les stades juvéniles (*Cytophaga-Flavobacteria* par exemple) sont supplantées par des espèces appartenant aux groupes *Actinobacteria* et *β -proteobacteria* (Pohlen, *et al.*, 2010).

D'une manière générale, les espèces impliquées dans les premiers stades présentent des propriétés adhésives et un fort taux de croissance. Leur temps de doublement est compris en 1 et 8 H dans le cas d'un biofilm de rivière. Dans ce milieu, le biofilm qui se forme est continuellement en interactions avec la colonne d'eau. Il est alors riche en oxygène dissous, les espèces présentes sont donc essentiellement aérobies. Lorsque le biofilm devient mature et qu'il développe sa structure tridimensionnelle, la diffusion de l'oxygène dans les zones les plus profondes est limitée favorisant la présence de taxons moins exigeants de ce point de vue (anaérobies stricts ou facultatifs). Les biofilms matures favorisent également la présence d'organismes capable de consommer les produits des autres organismes (polysaccharides extra-cellulaire, ammoniacque, acides organiques). Des microgradients sont présents dans ces biofilms (Lyautey, *et al.*, 2005).

Dans les stades précoces du développement du biofilm, la présence de flagellés hétérotrophes provoque l'augmentation de la concentration bactérienne à la fois sous la forme de micro-colonies et de cellules isolées. Par contre, dans les stades plus tardifs (après 3-4 jours), la présence de flagellés amène les bactéries à se présenter presque exclusivement sous la forme de micro-colonies. La formation de ces micro-colonies peut être interprétée comme une stratégie de défense contre les organismes brouteurs. Les flagellés hétérotrophes ne semblent tout de même pas être assez nombreux dans les biofilms naturels pour pouvoir contrôler la concentration bactérienne des biofilms (Wey, *et al.*, 2008).

La composition spécifique de la communauté de flagellés se modifie également avec la succession des proies bactériennes. En effet, les espèces qui se nourrissent de proies planctoniques sont progressivement remplacées par des espèces brouteuses (Wey, *et al.*, 2008).

2.4.3 Les avantages procurés par la formation du biofilm

La formation du biofilm confère plusieurs avantages aux bactéries (Jefferson, 2004) notamment vis-à-vis des stress qu'elles peuvent subir de la part de leur environnement. De ce point de vue, un biofilm peut être considéré comme une stratégie de défense en réponse à ces stress.

Les organismes des biofilms résistent mieux que les organismes planctoniques aux déficits en nutriments, aux variations de pH, aux chocs osmotiques, aux radicaux libres, aux désinfectants ainsi qu'aux antibiotiques. Ils protègent aussi des dommages provoqués par les forces de cisaillement, les UV, la dessiccation, la prédation. Dans la plupart des cas, c'est la matrice qui fournit principalement cette protection (Flemming, 1993, Costerton, *et al.*, 1999, Elasri & Miller, 1999, Davey & O'Toole, 2000, Jefferson, 2004, Nikolaev & Plakunov, 2007, Monds & O'Toole, 2009).

La protection contre les agents antimicrobiens dépend à la fois de l'agent chimique mais également du type de biofilm et de sa structure. Dans certains cas, la diffusion de l'agent antimicrobien peut être retardée dans la matrice, mais ce n'est pas un phénomène général. La matrice est en effet capable de limiter l'entrée de certains agents anti-microbiens en agissant comme un échangeur d'ions (Flemming, 1993, Costerton, *et al.*, 1999, Davey & O'Toole, 2000, Jefferson, 2004).

Les mécanismes de résistance peuvent aussi passer par un changement phénotypique des bactéries au sein même de l'environnement formé par le biofilm : production de polymères et d'enzymes extra-cellulaires visant à inactiver les antibiotiques, un taux de croissance ralenti par une limitation des nutriments. Le système de "quorum sensing" peut intervenir dans les mécanismes de résistance aux antibiotiques (Davey & O'Toole, 2000, Mah & O'Toole, 2001).

Les changements d'expression des gènes lorsque les cellules intègrent un biofilm, peuvent donc être responsables de cette résistance. L'antibiotique peut, en effet, pénétrer dans le biofilm mais ne pas trouver de cible appropriée dans le système enzymatique produit alors par les cellules. Ce phénotype peut également permettre l'expression de pompes à efflux empêchant l'efficacité d'antibiotiques spécifiques (Costerton, 2007).

Il a également été montré que les cellules sessiles à croissance lente posent problème à certaines classes d'antibiotiques, et que les zones anaérobies avec une forte concentration de protons peuvent fournir un milieu dans lequel certains agents anti-bactériens ne peuvent pas fonctionner (Costerton, 2007).

La présence de cellules appelées "persisteur" est importante dans le processus de résistance au stress lié aux composés biocides et aux antibiotiques. En effet, quelques cellules survivent toujours à l'application d'un seul stress. Ces cellules survivantes sont distribuées à travers l'ensemble de la communauté du biofilm (Costerton, 2007). Lorsque le stress est levé, les cellules persistantes se retrouvent dans un environnement nutritif favorable, grâce notamment à la libération dans le biofilm du contenu cellulaire des cellules mortes. Ces conditions permettent ainsi au biofilm de présenter un taux de croissance important (Costerton, 2007). Ces « cellules persistantes » ne sont pas des cellules qui ont muté et ne représentent pas non plus un stade particulier dans le cycle cellulaire, ni un état particulier de dormance. Leur formation et leur maintien dépend fortement de la densité de la population. Il est aussi possible qu'un facteur du "quorum sensing" soit impliqué dans leur formation (Spoering & Lewis, 2001).

La proximité des bactéries les unes vis-à-vis des autres, dans le biofilm, engendre un taux important de transferts horizontaux de gènes et le taux de recombinaison en est ainsi accéléré. Ces processus expliquent en partie la diversité génomique importante observée au sein des biofilms grâce à laquelle la communauté bactérienne qui le compose offre une meilleure résistance aux antibiotiques (Costerton, 2007).

Un biofilm favorise un comportement communautaire des organismes qui le constituent et notamment les liens de coopération trophique (Costerton, *et al.*, 1995, Jefferson, 2004). L'échange de substrats métaboliques est facilité et permet la disparition des "déchets" du métabolisme. Les biofilms représentent un environnement idéal pour l'établissement de relations syntrophiques : les bactéries de deux types métaboliques différents dépendent alors les unes des autres pour utiliser certains substrats. Ce phénomène est particulièrement présent dans le cas de la production d'énergie. Cette coopération permet la dégradation de nutriments complexes insolubles dans les écosystèmes naturels (Davey & O'Toole, 2000, Costerton, 2007).

Cette communauté fournit également une protection efficace contre les stress nutritifs. Chaque cellule contient tous les éléments nécessaires à sa survie. Lorsque des cellules meurent, elles relarguent ainsi leur contenu cellulaire, qui est alors retenu dans la matrice permettant la survie des autres cellules (Costerton, 2007).

2.4.4 Influence de l'environnement sur le développement des biofilms

Les micro-organismes dominants des biofilms s'établissent dans un 1^{er} temps en fonction des caractéristiques physiques, chimiques et biologiques de l'environnement. Ils peuvent ensuite, par leur activité, modifier les conditions physico-chimiques du micro-environnement que représentent le biofilm et ainsi induire d'autres changements qualitatifs des populations (Characklis, 1981, Characklis & Marshall, 1990, Lau & Liu, 1993, Horn, *et al.*, 2003).

Les principaux facteurs influençant la formation du biofilm sont le pH, la salinité, l'osmolarité, la pression partielle en oxygène, l'accessibilité des sources de nutriments, l'hydrophobicité de l'interface, la force et le type de déplacement du liquide par rapport à cette surface. Certains facteurs peuvent avoir une influence différente en fonction de l'espèce bactérienne considérée dans le cadre de biofilms monospécifiques (Nikolaev & Plakunov, 2007).

Les multiples facteurs influençant le développement du biofilm, ne peuvent que très rarement être considérés indépendamment les uns des autres. L'épaisseur du biofilm, par exemple, dépend des conditions de croissance c'est-à-dire à la fois des conditions hydrodynamiques, de la concentration en nutriments, des espèces bactériennes présentes mais également de la présence d'organismes brouteurs (Horn, *et al.*, 2003).

Un autre exemple est donné par le dépôt de particules dans un biofilm, déterminé par la topographie de la surface, elle-même liée à la présence de diatomées pennées et à leur interaction avec l'hydrodynamisme, en particulier à travers la formation de micro-tourbillons. D'autres processus tels que la mobilité cellulaire sont également mis en jeu (Characklis & Marshall, 1990, Augspurger, *et al.*, 2010).

D'une manière générale, les effets des stress environnementaux peuvent être indépendants mais ils entrent le plus souvent en combinaison pour s'ajouter ou se masquer mutuellement (Chenier, *et al.*, 2006).

2.4.4.1 Importance du régime hydraulique

L'un des éléments les plus influents dans le développement du biofilm est le facteur hydraulique. Comme évoqué précédemment, le régime hydraulique influence la structure même du biofilms en induisant, par exemple, la formation de "streamers" à l'extrémité des micro-colonies (chapitre 2.4.1.4).

Les forces hydrodynamiques associées à la topographie du biofilm présent influencent le transport de cellules vers et dans le biofilm. Ultérieurement, leur intégration effective dans le biofilm, leur adaptation et leur multiplication, dépendent de l'espèce concernée. L'ensemble de ces facteurs déterminent par conséquent la composition de la communauté bactérienne et sa diversité (Augspurger, *et al.*, 2010).

L'augmentation de la vitesse de l'eau peut avoir des effets positifs ou négatifs pour le biofilm. Elle peut stimuler sa croissance grâce à une amélioration du transport des nutriments (O₂ par exemple) depuis la colonne d'eau mais également grâce à une augmentation du nombre de cellules qui viennent au contact de la surface (Gantzer, *et al.*, 1991, Lau & Liu, 1993, De Beer, *et al.*, 1996, Hunt & Parry, 1998, Stoodley, *et al.*, 1999, Rochex, *et al.*, 2008). L'augmentation de la vitesse de l'eau est aussi responsable du décrochage de cellules ou de fragments du biofilm (Lau & Liu, 1993, Stoodley, *et al.*, 1999, Battin, *et al.*, 2003). L'importance de la biomasse qui se détache est en liaison avec l'épaisseur du biofilm et donc avec son âge (Horn, *et al.*, 2003).

Des forces de cisaillement importantes tendent à maintenir les biofilms dans un état juvénile ou à ralentir son évolution vers le stade de maturité (Stoodley, *et al.*, 1999, Rochex, *et al.*, 2008). Elles sont également responsables d'une baisse de la diversité bactérienne (Rickard, *et al.*, 2004, Besemer, *et al.*, 2007, Rochex, *et al.*, 2008).

L'hydrodynamisme a aussi une influence sur la communauté eucaryote du biofilm : les ciliés colonisent des biofilms sur substrats artificiels plus rapidement lorsque la vitesse de l'eau est plus faible. Il existerait une inhibition directe de l'attachement des ciliés sur des surfaces vierges par des vitesses trop importantes (Risse-Buhl & Küsel, 2009).

Les biofilms matures développés dans un flux plus lent sont plus épais avec une biomasse plus importante, ils sont également plus sinueux, donc moins denses et moins rugueux que les biofilms développés dans un écoulement rapide (Characklis, 1981, Hunt & Parry, 1998, Battin, *et al.*, 2003). Ils peuvent être détachés par une brusque augmentation des forces de cisaillement et il a parfois été observé que leur résistance augmente lorsqu'une nouvelle communauté se développe à partir des restes de l'ancienne (Costerton, 2007).

Les biofilms se développant sous un régime laminaire sont irréguliers et composés de groupes de cellules plus ou moins circulaires séparés par des espaces vides parfois couverts par des cellules seules. A l'inverse sous un régime turbulent, les groupes de cellules prennent la forme de rides perpendiculaires au flux et se terminent par des "streamers" qui oscillent dans le flux. Les structures ridées, situées à espaces réguliers, suggèrent l'existence d'un transport de matériel cellulaire et de polymères relié aux courants, à l'interface biofilm – eau libre (Stoodley, *et al.*, 1999).

Le régime hydraulique influence également l'importance de la surface de substrat colonisée par le biofilm mature (Stoodley, *et al.*, 1999). A l'inverse, la porosité et la fragmentation du biofilm ne sont pas affectés par la vitesse de l'eau (Battin, *et al.*, 2003).

Le changement de la densité du biofilm en fonction du régime hydraulique peut être lié à la présence de certaines espèces bactériennes, d'une réponse métabolique microbienne face au stress environnemental, et des forces de pression du fluide qui auront tendance à « essorer » le biofilm. La densité du biofilm joue un rôle important dans les processus de diffusion à l'intérieur du biofilm (Characklis, 1981).

Sous d'importantes forces de cisaillement, le rapport exopolysaccharides/cellules est élevé permettant d'augmenter l'adhérence des cellules. Ce phénomène est une réponse fonctionnelle du biofilm aux contraintes de l'érosion (Battin, *et al.*, 2003)

La vitesse de l'eau peut modifier l'effet causé par la rugosité du substrat sur la dynamique de la colonisation bactérienne au cours de ses premiers stades de colonisation. La présence de microrugosités sur le substrat permet d'augmenter sa colonisation par les bactéries lorsque la vitesse de l'eau est suffisante. Dans ce cas, la présence de microrugosité augmente les mouvements de convection et favorisent ainsi la colonisation bactérienne. Cet effet disparaît lorsque l'on s'intéresse à des biofilms matures (Hunt & Parry, 1998). Considérée seule, la rugosité du substrat n'a pas d'effet sur les concentrations en flagellés qu'ils soient autotrophes ou hétérotrophes (Hunt & Parry, 1998).

2.4.4.2 Influence du type de substrat et de la qualité de l'eau

Les nutriments et plus particulièrement le type et la qualité de la matière organique influencent la communauté bactérienne du biofilm (Olapade & Leff, 2006). Bien qu'ils s'établissent sur des substrats inorganiques et que les concentrations en nutriment des cours d'eau soient généralement faibles, le développement des biofilms y est rarement limité par les nutriments (Hoellein, *et al.*, 2010). Les biofilms développés sur des substrats organiques sont pourtant moins sensibles aux variations des concentrations en nutriments de la colonne d'eau que ceux développés sur des substrats inorganiques (Hoellein, *et al.*, 2010).

D'une manière générale, le type de substrat sur lequel se développe le biofilm induit des différences fondamentales dans la structure des biofilms (Rogers, *et al.*, 1994, Hoellein, *et al.*, 2010). Ainsi l'utilisation de coupons en argile ou en papier de verre engendre une plus grande diversité de protistes par rapport aux biofilms développés sur les substrats naturels (Hunt & Parry, 1998, Risse-Buhl & Küsel, 2009). Les substrats inorganiques favorisent les autotrophes, probablement à travers une limitation des hétérotrophes par une carence en carbone organique (Hoellein, *et al.*, 2010). L'utilisation d'inox, de PEX (polyéthylène réticulé) ou de PVC n'a pas d'influence sur le développement du biofilm (KIWA, 2008). Par contre, l'utilisation d'un substrat en cuivre est défavorable au développement du biofilm : ce type de substrat diminue à la fois la concentration bactérienne et sa diversité. Les substrats en cuivre sont responsables de la disparition des protistes. De plus, une partie des molécules de cuivre diffuse généralement dans la colonne d'eau et s'accumule dans des biofilms situés plus en aval. Le cuivre peut donc avoir un effet inhibiteur à distance, et plus particulièrement sur *Lpn* (Rogers, *et al.*, 1994, KIWA, 2008). En laboratoire, de nombreuses surfaces utilisées en tuyauterie permettent une présence plus importante de *Lpn* dans les biofilms par rapport à une surface en verre. C'est le cas de l'inox et surtout des matières plastiques. Ces matières favorisent également la présence de l'ensemble des bactéries du biofilm, mais d'une manière beaucoup moins importante (Rogers, *et al.*, 1994).

La comparaison de biofilm développés sur du granite (poli ou non), de l'andésite, du polycarbonate et du plexiglas, montre, sur la base des mesures algales, bactériologiques et chimique, que le plexiglas est recommandé pour le suivi de biofilm de rivière par rapport aux autres matières testées (Kröpfel, *et al.*, 2006). L'utilisation du verre permet un développement de biofilm équivalent à du squelette de corail, c'est pourquoi le verre est utilisé pour l'étude des biofilms en barrière de corail (Witt, *et al.*, 2011).

Malgré des résultats contradictoires selon les études, les nutriments peuvent dans certaines circonstances être l'un des facteurs limitants de la production bactérienne du biofilm et influencer sa composition (Chenier, *et al.*, 2003).

Lorsque leur concentration est faible, la matrice mucilagineuse est moins colonisée et la présence d'espaces vides est plus importante (Diaz Villanueva, *et al.*, 2011). Une augmentation des éléments limitants, carbone et azote, provoque une réponse immédiate du biofilm, à la fois en terme de biomasse, mais aussi en termes morphologiques : les structures ridées disparaissent, les amas de cellules et les "streamers" sont plus larges, certains vont même fusionner et former ainsi une structure poreuse. Ces changements morphologiques mais également de biomasse sont réversibles lors du retour aux concentrations initiales en carbone et azote (Stoodley, *et al.*, 1999). La composition en nutriments a donc un impact sur l'architecture du biofilm (Moller, *et al.*, 1997).

La composition inorganique du biofilm varie avec la composition chimique de l'eau environnante et modifie la structure physique et biologique du biofilm. Le calcium, le magnésium et le fer affectent les liaisons inter-moléculaires des polymères de la matrice, responsables de l'intégrité structurale du biofilm. Des produits de corrosion ainsi que des solides en suspension peuvent être absorbés dans la matrice du biofilm et ainsi en modifier la structure. Une limitation par l'azote provoque la production de grandes quantités de polysaccharides extra-cellulaires (Characklis, 1981). Il semblerait que les biofilms naturels, développés aussi bien sur des substrats organiques qu'inorganiques n'aient pas de préférence face à l'apport de molécules azotées lorsque les formes présentes sont NH_4^+ et NO_3^- (Hoellein, *et al.*, 2010).

L'impact de composés toxiques sur les communautés aquatiques microbiennes dépend des conditions environnementales et peut donc varier dans le temps en liaison avec les variations de la composition chimique de l'eau. Les biofilms provenant de rivières différentes réagissent différemment à la présence d'un même polluant organique, tels que l'hexadécane, non seulement au cours de cycles annuels mais aussi d'une année sur l'autre si la chimie de l'eau est modifiée (Chenier, *et al.*, 2006).

La source de carbone peut significativement influencer à la fois la production des exopolysaccharides et plus globalement la composition de la matrice (architecture et formation de glycoconjugués par exemple). Les changements de la composition des EPS peuvent aussi être attribués à des changements d'abondance relative des membres du biofilm sous l'influence de la source de carbone (Chenier, *et al.*, 2006).

2.4.4.3 Effets combinés des facteurs vitesse de l'eau et concentration en nutriments

Dans les chapitres précédents, nous avons considéré séparément les effets de la vitesse de l'eau et des nutriments alors que dans la réalité les biofilms sont soumis simultanément à ces deux facteurs. Dans les faits, la vitesse de l'eau n'a pas le même effet sur l'épaisseur des biofilms selon les concentrations en nutriments. Lorsque ces derniers sont en forte concentration, l'augmentation de la vitesse provoque une baisse de l'épaisseur du biofilm, tandis qu'à plus faible concentration, elle n'a pas d'effet marqué. Le bénéfice procuré par l'augmentation de la vitesse en termes d'augmentation du flux de nutriments dans les biofilms n'existe que lorsque les concentrations en nutriments sont faibles. A l'inverse, l'érosion engendrée par l'augmentation des forces de cisaillement se produit quelle que soit la concentration en nutriments (Characklis, 1981).

Un diagramme permet de prédire le morphotype du biofilm en fonction de l'influence relative des nutriments et des forces de cisaillement (Figure 9). Ce diagramme se base tout à la fois sur des considérations observées et théoriques. La zone « sans croissance » montre qu'une concentration minimale en nutriments est requise pour la croissance du biofilm, mais également qu'au-dessus d'une certaine importance des forces de cisaillement les cellules ne peuvent pas rester fixées sur le substrat. Pour les valeurs importantes des forces de cisaillement, le facteur vitesse a une forte influence, les transferts de masse ne sont pratiquement pas limités, on observe des structures planes limitant les courants, dont l'épaisseur dépend de la concentration en nutriments. Lorsque les forces de cisaillement sont faibles, la limitation des transferts de masse est plus importante : les biofilms sont alors des structures très poreuses dans lesquelles la surface des zones d'échanges est très développée (Stoodley, *et al.*, 1999).

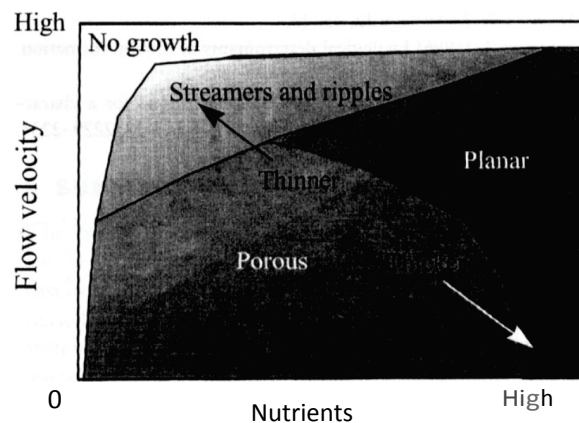


Figure 9 : Détermination du morphotype du biofilm en fonction de la vitesse de l'eau et de la concentration en nutriments (Stoodley, *et al.*, 1999)

En milieu courant, l'arrêt du flux peut également provoquer le détachement du biofilm en réponse à la carence nutritive ainsi créée (arrêt du flux de nutriments) (Hunt, *et al.*, 2004).

2.4.4.4 Influence de la température

La température est également un paramètre environnemental pouvant modifier le développement et la structure générale du biofilm. Une augmentation de 3°C n'est pas responsable de changement de la biomasse du biofilm (Diaz Villanueva, *et al.*, 2011). La réponse du biofilm à des augmentations de température de faible amplitude est fortement modulée par les interactions entre ses composants (Diaz Villanueva, *et al.*, 2011). Une augmentation plus importante de la température permet d'obtenir un biofilm mature plus épais, plus dense, une plus grande diversité bactérienne et modifie la contribution des différents groupes de micro-organismes. Le taux de croissance maximum est supérieur lorsque les températures sont plus importantes, les algues apparaissent également plus tôt avec une concentration plus importante de cyanobactéries filamenteuses (Vervaeren, *et al.*, 2006, Diaz Villanueva, *et al.*, 2011).

Dans le cas de biofilms monospécifiques, l'effet de la température sur l'adhésion microbienne est fortement dépendante des espèces. Deux grands types d'effet sont connus :

- Une adhésion maximale pour les températures correspondantes à la gamme de température de croissance (*P. fluorescens*, *E. cloacae*, *Chromobacter sp...*).
- Une adhésion observée pour des températures non-optimales, voire des températures normalement non compatibles avec la croissance de l'organisme (*S. epidermis*, *A. fulgidus*) : l'adhésion et la formation du biofilm est alors une réponse face au stress thermique

2.4.4.5 Effets combinés de la température et de la concentration en nutriments

L'association entre la température et la concentration en nutriments met en évidence un comportement particulier des différentes enzymes. La concentration en β -glucosidase est supérieure lorsque les nutriments sont plus concentrés, et elle est maximale lorsque la température et la concentration en nutriments sont les plus importantes. L'activité des peptidases augmente également avec la température et la concentration en nutriments, considérées indépendamment. Les phosphatases voient leur activité varier dans le temps différemment selon la concentration en nutriments uniquement (Diaz Villanueva, *et al.*, 2011).

Il en est généralement de même avec les grandes fonctions. Ainsi, la respiration et la production primaire dans le biofilm mature sont maximales lorsqu'elles sont associées à une température plus élevée et à une concentration en nutriments plus importante (Diaz Villanueva, *et al.*, 2011).

La relation est inverse dans le cas de certains organismes, comme les diatomées dont les plus fortes concentrations sont associées aux environnements les plus pauvres, avec des températures plutôt basses (Diaz Villanueva, *et al.*, 2011).

Le couple température/nutriments n'influence pas la concentration en ciliés, mais il joue sur la rapidité du passage entre les groupes dominant des biofilms juvéniles et ceux des biofilms matures, c'est-à-dire entre les hyménostomates et les pérित्रiches. Le changement est, là encore, le plus rapide lorsque ces deux facteurs sont plus élevés (Diaz Villanueva, *et al.*, 2011).

2.4.4.6 Influence de l'exposition lumineuse et effets combinés avec la matière organique

Les biofilms d'environnements naturels exposés à la lumière du soleil se caractérisent par une plus forte diversité trophique (phototrophes et hétérotrophes) et phylogénétique (eucaryotes et procaryotes) et par une plus grande complexité que les biofilms qui colonisent des réseaux médicaux ou industriels où la lumière est absente (Battin, *et al.*, 2003).

Selon Lear et son équipe, la température et l'irradiation lumineuse du fond des cours d'eau sont les variables environnementales qui influencent le plus la structure de la communauté bactérienne. La lumière favorise la concentration des bactéries vivantes (Lear, *et al.*, 2008). Sa présence permet également le développement d'une communauté plus diverse, comprenant à la fois des organismes autotrophes et hétérotrophes. Les organismes autotrophes rejettent des molécules organiques bénéfiques pour l'activité et la croissance des hétérotrophes (Ylla, *et al.*, 2009).

En fait, l'association entre la présence ou l'absence de lumière et la qualité de la matière organique influence la biodiversité, la structure et la fonction du biofilm (Figure 10) (Ylla, *et al.*, 2009). En présence de lumière, la biomasse algale est plus importante, l'activité photosynthétique fournit alors de la matière organique fraîche pour les hétérotrophes. Du point de vue enzymatique, les exsudats algaux augmentent l'activité leucine-aminopeptidase dans la matrice du biofilm. Si du glucose est ajouté, la communauté bactérienne devient plus hétérotrophe (bactéries filamenteuses). Dans ces conditions, la présence de polysaccharides et leur utilisation par l'activité β -glucosidase augmente.

En l'absence de lumière et de matière organique labile, un biofilm plus fin et moins diversifié se développe. Les organismes hétérotrophes de ce biofilm dépendent de la matière organique plus réfractaire présente dans la colonne d'eau. L'ajout de glucose facilite le développement de bactéries filamenteuses produisant des EPS augmentant ainsi la disponibilité des polysaccharides, les composés protéiques sont moins présents que dans les biofilms développés en présence de lumière (Ylla, *et al.*, 2009).

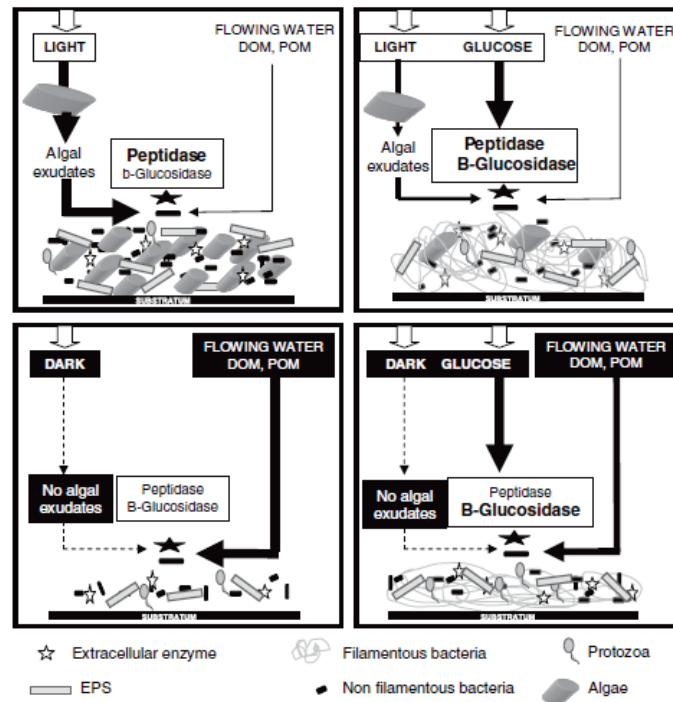


Figure 10: Représentation de la structure et de l'activité du biofilm en fonction de la disponibilité en glucose et en lumière (Ylla, *et al.*, 2009)

2.4.4.7 Effets saisonniers

Les caractéristiques des biofilms présentent généralement des variations saisonnières et leurs fluctuations ne sont pas toujours simultanées à celles de la communauté bactérienne planctonique (Henrici, 1933, Geesey, *et al.*, 1978).

L'abondance des bactéries des biofilms et leur diversité subit l'influence des saisons en réponse à différentes variables environnementales (hydrodynamique, intensité lumineuse, température) et aux apports en nutriments (Lyautey, *et al.*, 2005, Olapade & Leff, 2006). Ces changements saisonniers peuvent engendrer une réponse variable du biofilm face à un même stress (Chenier, *et al.*, 2003). La diversité est généralement supérieure dans les biofilms développés au cours de l'été, pour des débits relativement faibles et des températures chaudes (Hoellein, *et al.*, 2010).

Le rapport entre les algues et les bactéries du biofilm dépend évidemment, lui aussi, de la saison et peut être mis en rapport avec des modifications fonctionnelles (activité hétérotrophe) de la communauté microbienne. Dans leur étude, Chenier *et al.* (2003), montrent que l'activité de biofilms de rivière est similaire en hiver et au printemps, tant que les conditions physico-chimiques du cours d'eau étudié restent les mêmes. La différence de température entre les deux saisons ne suffit donc pas à modifier l'activité et la composition bactérienne du biofilm.

Les espèces de ciliés changent aussi selon la saison. Au printemps, la communauté est plus proche de la communauté hivernale que de la communauté estivale avec la présence d'espèces adaptées au froid et ayant un optimum thermique plutôt faible (Kathol, *et al.*, 2009).

La vitesse de colonisation des biofilms par les ciliés durant les premiers stades de l'établissement des biofilms, s'accélère avec l'augmentation de la température de l'eau. Ce résultat est plus ou moins marqué selon la saison et donc selon la température de départ de l'eau. Un ajout de nutriments permet d'accroître l'effet de la température sur les phases initiales de développement du biofilm montrant, une nouvelle fois, mais ici à propos des eucaryotes, la forte interaction entre ces 2 paramètres. La combinaison de ces 2 facteurs est donc un facteur clé dans les processus de colonisation des biofilms par les ciliés (Norf, *et al.*, 2007).

Les variations saisonnières des flagellés planctoniques semblent expliquer les variations saisonnières observées au sein des biofilms. C'est le cas, par exemple, des concentrations plus fortes des flagellés hétérotrophes en avril qu'en octobre, observées dans les deux milieux (Wey, *et al.*, 2008).

Dans l'environnement ces différents facteurs agissent simultanément sur le développement des biofilms si bien que les facteurs d'influence peuvent être plus locaux que globaux : la population bactérienne d'un biofilm, peut ainsi dépendre plus de la position du biofilm sur un même galet, par exemple, que de sa position le long du cours d'eau. Mais une communauté pourra également varier de manière plus importante dans le temps (à l'échelle de plusieurs semaines) que dans l'espace, à une échelle de quelques mètres (Lear, *et al.*, 2008). Ces constats suggèrent la nécessité pour un descripteur d'atteindre des valeurs seuils (particulièrement élevées ou particulièrement basses) pour s'imposer au-dessus des contraintes locales. C'est probablement l'une des principales difficultés de la modélisation du développement des biofilms dans les milieux naturels (Lear, *et al.*, 2008).

2.4.5 Biofilms et Légionelles

2.4.5.1 Biofilms sur milieu de culture

Lpn est capable de former un biofilm monospécifique, sur différents types de substrats (sur du verre, du polystyrène et du polypropylène) à des températures de 25°C, 37°C et 42°C mais uniquement si le milieu est assez riche. La température influence alors l'épaisseur et la structure du biofilm (Mampel, *et al.*, 2006, Piao, *et al.*, 2006). Dans les conditions testées, le développement de *Lpn* dans les biofilms provient de son recrutement à partir de la colonne d'eau et non pas d'une multiplication extra-cellulaire dans le biofilm lui-même. Il est également possible que la réplication de *Lpn* soit trop lente pour être visible à travers la formation de micro-colonies (Mampel, *et al.*, 2006).

Cultivée en milieu liquide riche en nutriments, *Lpn* présente des capacités supérieures à former un biofilm par rapport aux autres espèces du même genre (Piao, *et al.*, 2006). La température a un effet important sur la structure de ces biofilms. A 25°C, ils ont une architecture classique avec la présence de structures en forme de colonnes et de champignons séparées par des canaux. A une température d'incubation de 37°C, la densité cellulaire augmente jusqu'à former un tapis cellulaire dans lequel les canaux disparaissent (Piao, *et al.*, 2006). A cette température, la morphologie de *Lpn* se modifie, les bacilles courts prennent la forme de filaments. Le biofilm prend alors l'aspect d'un mélange de mycéliums comme avec des champignons. La température reste donc un facteur déclenchant le polymorphisme de *Lpn* même au sein des biofilms. Les *Lpn* qui quittent ensuite le biofilm gardent cette forme filamenteuse. L'agitation du milieu permet de maintenir la forme "bacilles courts". Ce changement de morphologie n'est pas influencé par la nature du substrat sur lequel se développe le biofilm (Piao, *et al.*, 2006).

L'augmentation de la température de 25°C à 37°C agit également sur la structure du biofilm qui devient plus épais. Il se forme plus rapidement et le décrochage de cellules apparaît plus rapidement (Piao, *et al.*, 2006).

La nature du support a également son importance. Comme pour l'ensemble des bactéries des biofilms, les supports en cuivre inhibent la forme cultivable de *Lpn*. Cette inhibition reste tout de même dépendante de la température : elle existe à des températures de 30, 50 et 60°C mais elle disparaît à 40°C. A 40°C, la concentration en *Lpn*_{cultivables} reste tout de même inférieure à celle obtenue sur un support composé de matières plastiques (Rogers, *et al.*, 1994). La nature du support peut également modifier l'effet de la température sur le biofilm. Sur du verre ou du polystyrène, le développement du biofilm est plus important pour des températures supérieures ou égales à 37°C, tandis que sur du polypropylène, l'inverse se produit, avec un développement plus important à 25°C (Piao, *et al.*, 2006).

L'intégration de *Lpn* dans les biofilms monospécifiques est possible lorsqu'ils sont constitués par des espèces telles qu'*Empedobacter breve*, *Microbacterium sp.* et *Acinetobacter baumannii* et non par des espèces telles que *Pseudomonas spp*, *Corynebacterium glutamicum* ou *Klebsiella pneumonia*. Cette observation suggère l'induction par certaines bactéries de mécanismes limitant l'adhérence de *Lpn*. Comme les biofilms naturels peuvent contenir à la fois des espèces qui potentialisent l'installation de *Lpn* et des espèces qui s'y opposent, il serait intéressant de mieux connaître les espèces en présence ainsi, bien entendu, que la nature des mécanismes mis en jeu (Mampel, *et al.*, 2006, Declerck, 2009).

2.4.5.2 *Lpn* dans les biofilms environnementaux

Les biofilms jouent un rôle important dans le maintien et le développement de *Lpn* dans l'environnement. En fait, la bactérie apparaît dans les premiers jours du développement des biofilms et peut représenter jusqu'à 35% de la flore des biofilms d'un réseau à 40°C dans des conduites en PVC (Rogers, *et al.*, 1994).

Contrairement aux recommandations effectuées pour limiter la contamination des réseaux d'eau par *Lpn*, les concentrations en légionelles dans un système simulant un réseau sont inférieures pour les biofilms développés en conditions stagnantes par rapport aux biofilms développés en présence d'un flux turbulent ou laminaire. Le flux turbulent est responsable de la plus forte accumulation de biofilm, par rapport au flux laminaire ou aux conditions stagnantes (Liu, *et al.*, 2006).

Il est possible qu'en plus de favoriser la probabilité des échanges entre l'eau libre et le support, les conditions turbulentes augmenteraient la disponibilité de l'oxygène et des nutriments dans le biofilm, favorisant alors la présence de *Lpn*. A l'inverse, la disponibilité de l'oxygène et des nutriments peut être limitée dans le biofilm en conditions stagnantes, expliquant les plus faibles concentrations de *Lpn* dans ces conditions (Liu, *et al.*, 2006). La montée en température de l'eau d'un réseau permet de limiter le développement du biofilm, mais ceci libère également de la matière organique morte, nutriments qui peuvent ensuite être utilisés par *Lpn*. Ainsi un traitement thermique visant à désinfecter un réseau peut, indirectement, promouvoir la croissance de *Lpn* et donc faciliter sa recolonisation rapide (Temmerman, *et al.*, 2006).

Lorsque *Lpn* est présente dans la colonne d'eau, elle est capable de coloniser un biofilm déjà en place ou en train de se développer afin de l'utiliser comme abri. Une fois le biofilm mature, des fragments s'en détachent dont certains peuvent contenir *Lpn* qui retrouve alors la colonne d'eau.

Vervaeren *et al.* (2006) ont montré que l'ajout de *Lpn* à un biofilm augmente la diversité de sa communauté eucaryote mais uniquement lorsque la température de l'eau est suffisante (1 choc de 30 minute à 60°C par semaine). A travers les changements induits dans la communauté eucaryote par les traitements thermiques, ces derniers peuvent alors être favorable au développement de *Lpn* dont la présence est elle-même responsable de la diversification de la communauté eucaryote du biofilm (Vervaeren, *et al.*, 2006).

Les biofilms sembleraient être l'un des rares environnements naturels au sein desquels *Lpn* est capable de se maintenir et de se multiplier en absence de protistes (Barbeau, *et al.*, 1998 ; Atlas, 1999). Les mécanismes par lesquels *Lpn* colonise, survit et se réplique dans les biofilms restent assez peu connus. La bactérie tire les nutriments essentiels à son développement des produits issus du métabolisme des autres membres du consortium bactérien, des exsudats algaux et des lyses cellulaires au sens large. La matrice lui permet donc de survivre dans un état VBNC qui lui permet d'attendre de rencontrer un nouvel hôte (Rogers & Keevil, 1992, Barbeau, *et al.*, 1998, Atlas, 1999, Murga, *et al.*, 2001, Vervaeren, *et al.*, 2006, Declerck, *et al.*, 2007). En présence d'amibes, par contre, la réplication se réalise par la voie intra-cellulaire au sein même du biofilm.

La réplication extra-cellulaire de *Lpn* dans les biofilms de l'environnement n'a pas encore été mise en évidence. Il est possible que son occurrence dépende des conditions environnementales (Declerck, 2009). Les systèmes construits en laboratoire pour l'étudier ne sont pas suffisamment représentatifs des biofilms environnementaux et des contraintes qu'ils subissent. Cela peut expliquer le fait que le développement extra-cellulaire de *Lpn* dans les biofilms, s'il se produit effectivement, échappe encore aux expérimentateurs (Taylor, 2009).

La présence de protistes est plus importante que l'expression des pili pour la colonisation et le maintien de *Lpn* dans les biofilms (Lucas, *et al.*, 2006). En l'absence d'amibes, les pili font tout de même partie des mécanismes qui permettent la colonisation des biofilms préalablement établis (Söderberg, *et al.*, 2004, Lucas, *et al.*, 2006). Le facteur sigma FliA est également impliqué dans la formation du biofilm (Spirig, *et al.*, 2008), peut-être à travers la régulation de l'expression du flagelle dont la présence peut favoriser le contact initial avec un support. Le détachement de *Lpn* du biofilm peut ensuite se produire soit par le processus de multiplication intra-cellulaire, soit par la lyse du protiste, soit, chez certaines amibes, par la formation et l'excrétion de vésicules contenant *Lpn* (Declerck, 2009).

En plus d'être présente dans les biofilms associés aux supports immergés, *Lpn* a également été retrouvée dans les biofilms se développant à l'interface air-eau (Declerck, *et al.*, 2007).

Malgré l'importance des biofilms pour le maintien de *Lpn* dans l'environnement, ils restent encore peu étudiés du fait de leur complexité et des nombreuses interactions qu'ils subissent, tout à la fois sur le plan externe, de la part de leur environnement, et sur le plan interne, de la part de leurs propres composantes. L'association de *Lpn* avec les protistes et, peut-être aussi, sa multiplication extra-cellulaire au sein des biofilms, rendent sa détection et son éradication des plus difficiles (Atlas, 1999).

Cette étude se place donc parmi un nombre plutôt réduit d'études environnementales concernant la présence et la régulation de *Lpn* dans les biofilms naturels. Nous souhaitons, en effet, effectuer un inventaire de sa présence dans les biofilms de cours d'eau, et mettre en évidence des facteurs naturels de régulation, qui pourraient peut-être être également utilisés dans d'autres milieux (réseaux d'eau chaude sanitaire par exemple). De plus, la présence d'arrivées d'eaux chaudes chargées en *Lpn* nous offre un environnement privilégié pour étudier cette bactérie dans l'environnement et mieux comprendre son devenir après son arrivée dans un cours d'eau. Des études en réacteurs biologiques viendront compléter les connaissances sur l'influence de la vitesse et de la température de l'eau sur le développement des biofilms et leur contenu en *Lpn*. En raison de l'importance des formes VBNC dans l'environnement, nous ne nous limiterons donc pas aux formes bactériennes cultivables, mais nous effectuerons également des dénombrements des bactéries et *Lpn* totales. Des essais de couplage de différentes sondes marquant la viabilité et de sondes de spécificité ont été effectués afin de mieux estimer *Lpn* sous sa forme VBNC, mais aucun résultat n'a été concluant. De telles mesures n'ont donc pas pu être utilisées dans cette étude.

Du fait de l'importance des autres organismes, et plus particulièrement des protistes, dans son cycle de développement, nous tenterons également de mettre en évidence ce processus de multiplication intracellulaire dans les biofilms environnementaux.

3 - Matériel et méthodes

3.1 Sites d'études

Chacun des volets de l'étude fait intervenir un groupe de stations différent.

Le premier volet est consacré à la distribution de *Lpn* dans les biofilms des principaux affluents du lac du Bourget. Il s'adresse à un groupe de 9 stations situées sur les principaux affluents du lac. Ces stations ont également été utilisées pour la comparaison des techniques d'échantillonnage des biofilms (substrats artificiels/substrats naturels).

Le second volet s'adresse plus spécifiquement à l'influence des rejets d'eaux thermales chargés en *Lpn* sur les biofilms du cours d'eau récepteur. Pour cela, 5 stations ont été définies tout au long du cours d'eau depuis la partie située à l'amont des rejets jusqu'à la confluence avec le lac du Bourget. Une seule station est commune aux volets 1 et 2.

Deux autres volets de l'étude sont consacrés spécifiquement aux effets de la vitesse et de la température de l'eau sur le développement des biofilms. Les expériences ont été réalisées dans des réacteurs biologiques à partir de biofilms provenant du bassin de rejet de l'établissement thermal Chevalley. Les réacteurs étaient placés au laboratoire et alimentés par de l'eau de la Leyse dans le cas des expériences sur la vitesse, et placés dans une galerie souterraine longeant la Chaudanne (cours d'eau récepteur des rejets d'eaux thermales) dans le cas des expériences sur la température.

3.1.1 Stations de l'étude du bassin versant du lac du Bourget

3.1.1.1 Présentation du lac du Bourget et de son bassin versant

Le lac du Bourget est un lac naturel de 18 km de long pour une largeur moyenne de 3 km et une profondeur maximale de 145 m. Sa superficie est de 44 km² (données Cisalb).

Il est alimenté par 5 affluents principaux plus ou moins urbanisés (Figure 11, Tableau 3) :

- La Leyse traverse Chambéry et atteint le lac du Bourget à son extrémité sud-ouest. Elle a 2 affluents principaux :
 - l'Albanne, qui rejoint la Leyse à l'amont de Chambéry
 - l'Hyères, dont le point de confluence se situe à l'aval immédiat de Chambéry.
- Le Sierroz traverse Aix-les-Bains, sa confluence avec le lac s'effectue au niveau du Grand Port d'Aix-les-Bains.
- Le Tillet se subdivise en deux branches en amont de l'hippodrome d'Aix-les-Bains. Une petite partie du débit poursuit son chemin vers le nord en direction d'Aix-les-Bains pour rejoindre la Chaudanne. La plus grosse partie du débit se dirige vers l'est pour rejoindre le lac au niveau de la plage dite "du Lido", après avoir traversé la colline de Tresserve.
- La Chaudanne est un cours d'eau essentiellement souterrain dans son parcours de la commune d'Aix-les-Bains. Il reçoit les eaux thermales provenant des sources et des rejets des établissements thermaux dans cette partie souterraine. Son arrivée au lac se situe au niveau du petit port d'Aix-les-Bains.
- Le canal de Terre Nue est une pièce d'eau de l'ordre du kilomètre qui se jette à l'extrémité sud-est du lac après avoir longé une partie de l'aéroport de Voglans.

Le Canal de Savières, situé à l'extrémité nord-ouest du lac est son exutoire naturel vers le Rhône. Le niveau du lac est régulé depuis 1982 du fait de l'existence d'un barrage situé sur le Rhône en aval de la confluence du canal. Le lac peut donc servir d'exutoire de crue pour le barrage et, de ce fait, constituer à son tour, un affluent.

Tableau 3 : Surface du bassin versant des principaux affluents du lac du Bourget

Station	Surface bassin versant
Leyse	280 km ²
Sierroz	130 km ²
Hyères	75 km ²
Albanne	46.5km ²
Tillet	34 km ²

3.1.1.2 Descriptions des stations échantillonnées

Les 9 stations suivies dans le premier volet de l'étude sont situées sur chacun des principaux affluents du lac, mais également sur le Canal de Savières ainsi que sur le lac lui-même, au niveau de la plage municipale d'Aix-les-Bains (Figure 11).

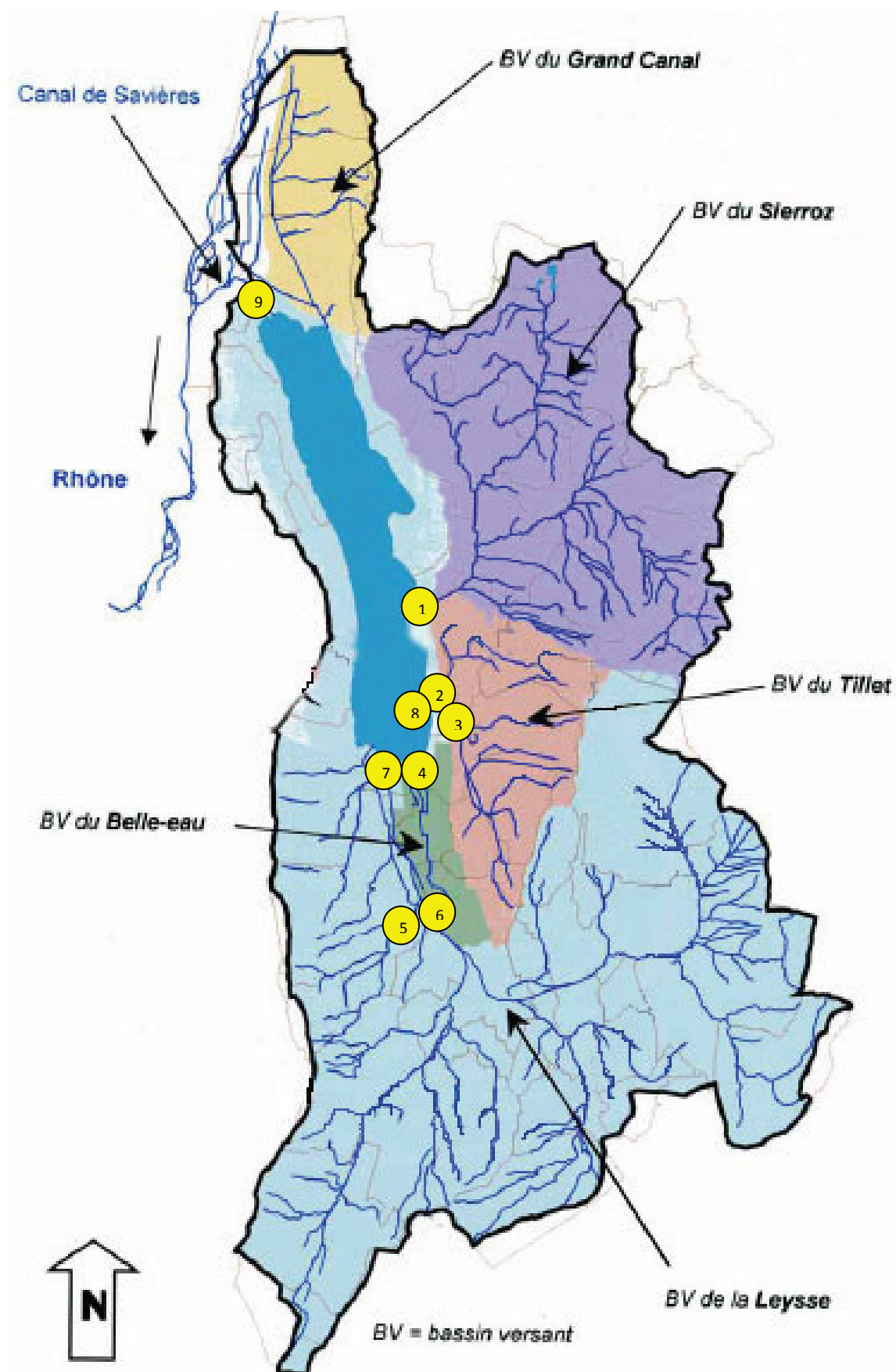


Figure 11: Bassin versant du lac du Bourget et sous bassins correspondants à ses affluents. Localisation des stations (1: Sierroz ; 2 : Aquarium ; 3 : Tillet ; 4 : Terre Nue ; 5 : Hyères ; 6 : Albanne ; 7 : Leysse ; 8 : Plage ; 9 : Savières)

Parmi les stations situées sur la commune d'Aix-les-Bains, celle située la plus au nord est la station Sierroz (n°1 ; SI). Les échantillons étaient disposés à proximité de la rive gauche du Sierroz à environ 50 m en amont du point de confluence avec le lac, face au camping municipal d'Aix-les-Bains. La largeur du Sierroz à ce niveau est d'environ 10 m, avec une profondeur maximale de 60 cm environ. La vitesse maximale mesurée sur la largeur est comprise entre 51 et 60 cm/s. Dans cette zone, la végétation des rives est importante, composée principalement d'une strate herbacée, le substrat est grossier. Les échantillons sont fixés à une profondeur comprise entre 20 et 50 cm selon le régime hydrodynamique, la vitesse de l'eau dans cette zone est d'environ 0.35 m/s. En conditions ensoleillées, les intensités lumineuses à la surface et sous l'eau sont respectivement de 765 et de 470 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, tandis qu'en présence d'une couverture nuageuse, elles sont inférieures à 100 et à 50 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$.

La station Aquarium (N°2 ; AQ) est la seule station souterraine de ce volet de l'étude, c'est une station entièrement busée située à l'extrémité aval de la Chaudanne à seulement quelques dizaines de mètres du lac, en amont du petit port d'Aix-les-Bains. Le diamètre de la buse est de 1.20 m. De faibles quantités de sédiments fins peuvent se déposer sur le fond de cette station. C'est la station qui présente les plus grandes vitesses (et donc les plus grandes forces de cisaillement) dans ce volet de l'étude. La vitesse de l'eau peut en effet y être supérieure à 1 m/s. L'accès à cette station s'effectue grâce à la présence d'une bouche fermée située dans la pelouse face à l'Aquarium. Les échantillons sont fixés à un crochet installé dans la gaine d'accès.

Les échantillons de la station Tillet (n°3 ; TI) étaient placés immédiatement en amont de la bifurcation du Tillet vers l'ouest (bifurcation située entre le golf et l'hippodrome), en direction de la colline de Tresserve. A ce niveau, les rives sont peu végétalisées (prairie éparse), et le cours d'eau est un peu encaissé (d'un mètre environ). L'intensité lumineuse à la surface de l'eau varie entre 350 et 3200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ en fonction de la couverture nuageuse, tandis que dans l'eau, elle passe de 150 à 1200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$. Les échantillons étaient déposés au niveau de la zone la plus profonde (environ 50 cm), mais ils sont maintenus à mi-profondeur. La vitesse dans cette zone est de 0.30 m/s environ.

La station située sur le ruisseau de Terre Nue (n°4 ; TN) se situe au sud-est du lac et longe une partie de l'aéroport. Ce ruisseau mesure environ 11 m de large pour une profondeur maximale de 80 cm à 1 m selon les conditions hydrologiques. Les échantillons étaient fixés au pont de la route départementale, au niveau de la zone la plus profonde mais étaient maintenus à une profondeur de 15 cm environ. Il s'agit d'une zone pseudo-stagnante dont le fond est principalement constitué de sédiments très fins. L'eau semble chargée en substances humiques. Dans cette zone les berges sont recouvertes d'une végétation arbustive assez dense ce qui explique que l'intensité lumineuse en surface reste faible (inférieure à 211 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$), tandis qu'elle est comprise entre 40 et 131 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ dans l'eau, au niveau des échantillons.

La station Hyères (n°5 ; HY) se situe sur l'un des 2 affluents principaux de la Leysse, au niveau de la commune de Cognin. La profondeur maximale mesurée varie entre 40 et 60 cm, et la largeur entre 7 et 11 m. La vitesse maximale varie entre 0.5 et 1.1 m/s. Les échantillons étaient fixés sur la rive droite, dans une zone plus calme et moins profonde. La profondeur de cette zone est en effet comprise entre 20 et 35 cm, pour une vitesse comprise entre 0.09 et 0.14 m/s. De plus, la vitesse dans cette zone est assez peu influencée par la vitesse de la zone axiale du cours d'eau. Alors que seule une végétation herbacée colonise la rive gauche, la végétation de la rive droite quant à elle est plus dense et de type arbustive voire arborée. L'intensité lumineuse en surface varie énormément (entre 34 et 1111 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) tandis que dans l'eau elle varie entre 15 et 610 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$.

La station Albanne (n°6 ; AL) se situe sur La Leysse immédiatement en amont du point de confluence entre l'Hyères et la Leysse. Elle correspond donc à la fois aux apports de la partie amont de la Leysse, mais également à ceux de l'Albanne. Sa largeur atteint 14.5 m, la profondeur maximale enregistrée a été comprise entre 50 et 55 cm. La vitesse maximale est de 0.82 m/s en période calme et peut atteindre 1.47 m/s après un épisode pluvieux. Une végétation arborée est présente sur les berges dans cette portion de la rivière. Les échantillons étaient fixés au niveau de la rive droite dans une zone où la profondeur maximale varie entre 30 et 40 cm pour une vitesse inférieure à 0.11 m/s. L'énergie lumineuse en surface est proche de celle mesurée sur l'Hyères. En effet, elle est comprise entre 15 et 1095 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$. Il en est de même pour les mesures effectuées dans l'eau, avec des valeurs comprises entre 10 et 535 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$.

Une autre station appelée Leysse (n°7 ; LE) est située sur la Leysse à une centaine de mètres en amont du point de confluence avec le Lac. Cette station est donc située à l'aval des points de confluence avec l'Albanne et avec l'Hyères. Dans cette zone, la Leysse a une profondeur maximale de 1.50 m pour une largeur de comprise entre 18 et 23 m en fonction du régime hydrologique. Le fond du cours d'eau est composé de sédiments grossiers, de galets et de bloc rocheux de taille supérieure à 20 cm. C'est à leur niveau que les substrats artificiels étaient placés, fixés à la rive gauche et maintenus à une dizaine de centimètres de profondeur. La vitesse maximale enregistrée au cours de nos campagnes se situe entre 0.4 et 0.8 m/s. Elle est beaucoup plus faible dans la zone d'incubation avec une valeur comprise entre 0.1 et 0.13 m/s. La végétation est importante sur les rives et peut apporter une zone d'ombre lors de l'incubation des lames. A sa surface, l'énergie lumineuse varie entre 40 et 580 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$; dans l'eau elle passe alors à des valeurs comprises entre 16 et 220 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$.

La station Plage (n°8 ; PL) se situe au niveau de la plage municipale d'Aix-les-Bains, à une cinquantaine de mètres de la rive au pied de toboggans aquatiques et donc à quelques mètres au sud du jet d'eau. La profondeur du lac à ce point est de 2.6 m, mais les échantillons sont maintenus à environ 15 cm de profondeur, dans une situation, qui les expose donc à la lumière. En surface, l'intensité lumineuse est comprise entre 250 et 4030 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ en fonction de la couverture nuageuse. A la profondeur d'incubation des biofilms, elle varie entre 80 et 1770 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$. Lorsque le vent est important la masse d'eau de surface peut se déplacer à une vitesse de quelques cm/s.

La dernière station est située sur l'exutoire du lac, il s'agit de la station Savières (n°9 ou SA). Les échantillons sont placés dans le canal de Savières à quelques dizaines de mètres du lac, ils sont fixés sur la rive gauche, à une profondeur de 25 cm environ dans une zone pseudo-stagnante au niveau de laquelle la largeur du canal atteint 21.85 m. La végétation des rives est dense et arborée, les échantillons sont continuellement à l'ombre. Par temps ensoleillé, l'intensité lumineuse atteint 390 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ à la surface de l'eau et 120 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ sous 25 cm d'eau, tandis que par temps plus nuageux elle est respectivement de 42 et 20 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$.

Les mesures de vitesse d'écoulement, de profondeur et d'intensité lumineuse citées précédemment doivent être considérées pour leurs ordres de grandeur (Figure 12 et Figure 13). En effet, ces mesures n'ont pas été effectuées durant la période des prélèvements mais au cours de 3 journées réparties entre le 19 avril 2010 et le 20 mai 2010, période durant laquelle les conditions météorologiques ont été contrastées. Le 19 avril 2010 correspond à une journée ensoleillée, l'absence de pluies au cours des 10 jours précédents a permis la stabilisation du débit à une valeur proche de celle de l'étiage. La deuxième série de mesure a été effectuée le 6 mai 2010 en présence d'une couverture nuageuse légèrement variable, après 5 jours de pluie. Quant à la troisième série de mesure, elle a été effectuée le 20 mai 2010 en conditions variables, avec une présence nuageuse moins importante que celle du 6 mai 2010. Cette journée est consécutive à 5 jours sans pluie, le régime hydrologique est donc intermédiaire par rapport à celui des deux autres journées.

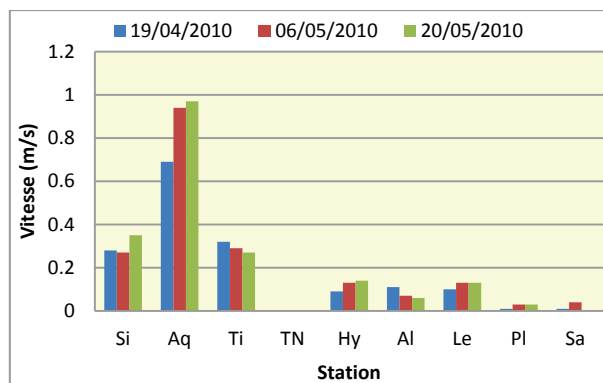


Figure 12: Mesures instantanées de la vitesse de l'eau au point d'incubation des biofilms

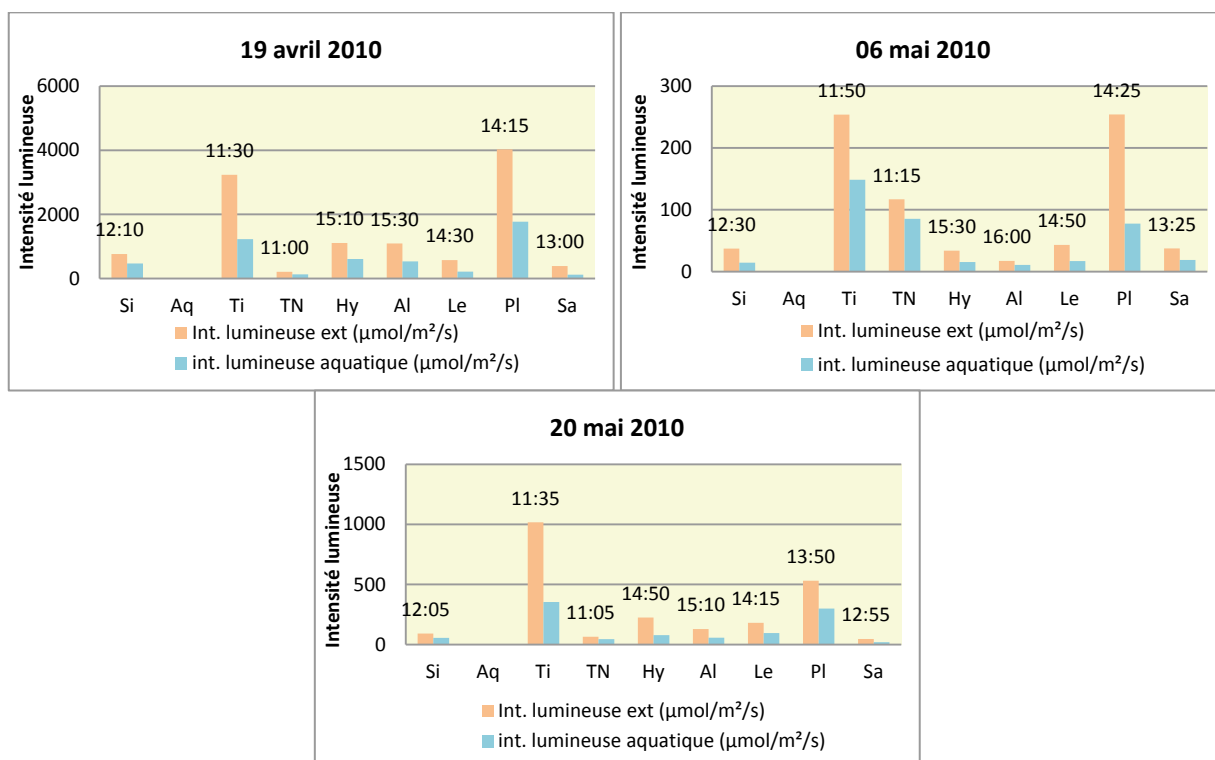


Figure 13: Mesures de l'intensité lumineuse en surface et aux points d'incubation des biofilms pour chacune des stations du bassin versant

Il est possible de regrouper les stations en fonction de la gamme de vitesse de l'eau au point d'incubation des lames. 4 groupes de stations peuvent ainsi être définis :

- Le groupe Savières, Terre Nue et Plage : ces stations présentent des vitesses très faibles voire nulles (<0.04 m/s) ;
- Le groupe Leyse, Hyères et Albanne : la vitesse de ces stations est comprise entre 0.07 et 0.13 m/s ;
- Le groupe Sierroz et Tillet : les valeurs de vitesse dans ces stations sont comprises entre 0.27 et 0.32 m/s ;
- La station Aquarium : elle présente des vitesses encore plus importantes du fait de sa canalisation (de 0.64 à 0.69 m/s).

Du point de vue de l'irradiation des stations, le regroupement des stations est moins facile. Seule la station Aquarium, qui est une station souterraine, se distingue des autres stations. Lorsqu'aucune couverture nuageuse n'est présente, les regroupements sont les suivants :

- Aquarium, seule station souterraine pour cette partie de l'étude ;
- stations Plage et Tillet qui présentent les plus fortes intensités lumineuses ;
- autres stations dont les valeurs d'irradiation sont intermédiaires et qui ne peuvent être discriminées par ce facteur.

L'analyse des résultats présentés plus loin dans ce mémoire est basée, pour partie, sur ces regroupements des stations (fonction de la vitesse de l'eau et de l'intensité lumineuse).

3.1.1.3 Les campagnes de prélèvement

Neuf campagnes de prélèvements ont été effectuées sur l'ensemble des stations du bassin versant en utilisant la technique d'échantillonnage des substrats artificiels (Tableau 4), et trois autres campagnes ont été effectuées en prélevant les biofilms sur les substrats naturels de ces stations.

Les substrats artificiels vierges sont incubés dans les cours d'eaux pour une période de 15 jours. Des essais effectués avant le début des campagnes de prélèvements nous ont montrés que cette durée d'incubation des lames suffisait à la colonisation par *Lpn*. Dans certains cas, les substrats ont été perdus (vandalisme, usure prématurée de leur fixation). Dès que leur disparition a été constatée, ils ont été remplacés par de nouveaux dispositifs. Ces pertes engendrent alors un décalage de la période d'incubation des biofilms pour ces stations.

Les trois campagnes de prélèvements des substrats naturels ont eu lieu le 6 mai 2008, le 7 octobre 2008, et le 6 mai 2009. Contrairement aux campagnes effectuées sur les substrats artificiels, durant lesquels l'échantillonnage des stations s'étend sur deux journées consécutives, une seule journée était nécessaire pour effectuer les prélèvements sur les substrats naturels.

Tableau 4 : Périodes d'incubation des substrats artificiels pour chaque station au cours des 9 campagnes de prélèvement

STATION	AOUT 2007		OCTOBRE 2007		JANVIER 2008		MARS 2008		MAI 2008		JUILLET 2008		OCTOBRE 2008		JANVIER 2009		MAI 2009										
	Dépôt	Retrait	Dépôt	Retrait	Dépôt	Retrait	Dépôt	Retrait	Dépôt	Retrait	Dépôt	Retrait	Dépôt	Retrait	Dépôt	Retrait	Dépôt	Retrait									
SAVIERES	14/8	29/8	1/10	16/10	7/1	22/1	3/3	18/3	14/4	29/4	15/7	30/7	1/10	16/10	6/1	21/1	27/4	12/5									
SIERROZ																											
AQUARIUM	30/8	14/9									22/1	6/2															
PLAGE	14/8	29/8									7/1	22/1															
TILLET	14/8	30/8																			25/7	9/8			21/1	6/2	
TERRE NUE	16/8	31/8	2/10	17/10	9/1	24/1	4/3	19/3	15/4	30/4	16/7	31/7	2/10	17/10	7/1	22/1	28/4	13/5									
LEYSSE																											
HYERES																											
ALBANNE									28/4	13/5																	

3.1.2 Prélèvements sur le réseau aixois

3.1.2.1 La Chaudanne et les stations échantillonnées

La Chaudanne est l'affluent du lac du Bourget, qui traverse la ville d'Aix-les-Bains et débouche sur le lac au niveau du petit port, à environ 300 m au nord de la Plage municipale. Elle participe en fait à un réseau hydrographique composé de deux bassins versant principaux, celui de la Chaudanne elle-même et celui du Tillet (Figure 14). La quasi-totalité de ce réseau est souterraine.

La Chaudanne est un ruisseau d'environ 4.7 km, qui draine la partie du bassin versant située en amont de la ville d'Aix-les-Bains. Il est alimenté par d'autres ruisseaux (Combo, Garins, Gâchets...). Au point de confluence avec le Tillet, le bassin versant de la Chaudanne est d'environ 6.4 km².

Le Tillet est un torrent de 12.7 km environ, il coule depuis les contreforts du Roc Noir en direction du nord. La surface de son bassin versant jusqu'à sa confluence avec la Chaudanne est de 34 km² (Piton, 2010). La confluence entre les deux rivières s'effectue au niveau du Boulevard Lepic à Aix-les-Bains, entre les stations Liège et Lepic.

Nous avons porté un intérêt particulier à ce réseau du fait qu'il reçoit les eaux potentiellement contaminées par *Lpn* provenant des sources thermales Soufre et Alun. La contamination par cette bactérie a nécessité l'arrêt de l'exploitation de l'eau thermale au niveau de ces résurgences naturelles et le forage de nouveaux puits pour que les établissements des Thermes Nationaux et des Thermes Chevalley puissent continuer à utiliser la ressource thermale. Grâce à ces puits, le prélèvement de l'eau s'effectue plus profondément, dans une zone non contaminée par *Lpn*.

Le réseau reçoit également les rejets des services de soins des Thermes Chevalley, qui représentent pour lui un apport d'eau chaude. Nous avons étudié l'influence de ces arrivées d'eaux chaudes sur le cours d'eau et plus particulièrement sur le développement des biofilms, grâce à 5 stations distribuées depuis l'amont du rejet des sources thermales jusqu'au débouché du réseau dans le lac (Figure 14).

La station Mirabeau est la seule station aérienne sur le réseau. Elle se trouve en amont de l'ensemble des arrivées d'eaux thermales, c'est pourquoi nous la considérons dans ce volet comme la station de référence, que ce soit vis-à-vis de la composition ionique de l'eau, du développement des biofilms ou de la présence de *Lpn*. Les substrats artificiels sont placés au niveau d'une petite excavation du fond du cours d'eau (mouille), dans laquelle s'est accumulé un sédiment fin.

La station Parking est située immédiatement à l'aval des rejets des sources Soufre et Alun, et en amont des rejets de l'établissement des Thermes Chevalley. L'accès à cette station s'effectue depuis le niveau -2 du parking de la mairie. Il s'agit de la première station souterraine, le diamètre de la buse est de 1.50 m. En général, l'eau atteint la mi-hauteur de la buse pour une vitesse moyenne d'environ 0.5 m/s. Un sédiment fin se dépose au fond de la buse. Au niveau de cette station, la pente est d'environ 0.75%.

La station Liège, se situe à l'aval de l'ensemble des apports d'eaux chaudes (sources et rejets des Thermes Chevalley). Comme l'on peut s'y attendre, il s'agit de la station présentant les plus fortes températures. L'accès à cette station s'effectue au niveau du croisement entre la rue de Liège et l'Avenue de Tresserve. Le diamètre de la buse est, là encore, de 1.50 m. La pente est plus importante (1.70 %) qu'au niveau de la station Parking. La hauteur de l'eau est généralement inférieure à 15 cm, avec une vitesse pouvant dépasser 3 m/s. Cette vitesse a posé des problèmes au cours des premiers prélèvements et il a d'ailleurs été nécessaire de modifier les dispositifs d'échantillonnages de manière à ce qu'ils supportent les contraintes qui lui sont liées. Les phénomènes de calcification sont également très importants au niveau de cette station, sans doute en raison de l'importance de l'évaporation.

La station Lepic est située à l'aval de la confluence avec le Tillet. L'accès à cette station s'effectue également depuis la chaussée, au niveau du croisement entre le boulevard Lepic et l'avenue d'Italie. Il s'agit d'un dalot de 3.45 m de large pour une hauteur de 1.50 m. La hauteur de l'eau est de 20 cm environ et sa vitesse est en moyenne de 0.5 m/s. Le fond est recouvert de substrats grossiers et de galets pour la plupart en provenance du ruisseau du Tillet.

La dernière station est la station Aquarium, station commune aux volets I et II de l'étude. Le diamètre de la buse est de 1.20 m ; elle est généralement remplie au moins à mi-hauteur. L'eau s'y écoule avec une vitesse moyenne de 0.7 m/s. Un substrat fin recouvre le fond de la buse dans sa partie centrale. Les éléments grossiers des sédiments de la station précédente sont piégés au niveau d'un court tronçon aérien situé quelques centaines de mètres en amont.

En raison des difficultés d'accès aux 4 stations souterraines, les échantillons ont été fixés au droit de l'ouverture sur chaussée et maintenus à proximité de la surface de l'eau afin d'éviter, autant que possible, leur contact avec les sédiments. Ils pouvaient ainsi s'orienter dans le sens des lignes de courant et subir l'influence directe de la vitesse de l'eau. L'absence de lumière et le type de substrat sont des paramètres dont il a été tenu compte dans l'interprétation des résultats. Les hauteurs d'eau ainsi que les vitesses indiquées ici, ont été mesurées sous différentes conditions hydrodynamiques et utilisées pour la construction des droites de tarage des limnigraphes.

3.1.2.2 Périodes d'échantillonnages

Les biofilms ont été échantillonnés uniquement grâce à la technique des substrats artificiels au cours de 6 campagnes (Tableau 5) :

- deux campagnes ont eu lieu en début d'hiver : décembre 2007 et 2008,
- deux campagnes ont eu lieu en début d'été : juin 2008 et 2009
- les deux dernières campagnes se sont déroulées au début de la période automnale (septembre 2008) et au début de la période printanière (mars 2009).

Tableau 5: Périodes d'incubation des substrats artificiels pour chaque station au cours des 6 campagnes effectuées sur le réseau aixois

	DECEMBRE 2007		JUN 2008		SEPTEMBRE 2008		DECEMBRE 2008		MARS 2009		JUN 2009	
	DATE DEPOT	DATE RETRAIT	DATE DEPOT	DATE RETRAIT	DATE DEPOT	DATE RETRAIT	DATE DEPOT	DATE RETRAIT	DATE DEPOT	DATE RETRAIT	DATE DEPOT	DATE RETRAIT
STATION												
MIRABEAU	29/11	14/12										
PARKING	20/11	5/12	2/6	17/6	2/9	17/9	25/11	10/12	2/3	17/3	8/6	23/6
LIEGE												
LEPIC												
AQUARIUM			3/6	18/6								

La station Liège n'a pas pu être échantillonnée lors de la première campagne de prélèvement (décembre 2007). La vitesse de l'eau était trop importante et a eu pour conséquence l'arrachage des tubes contenant les lames de verre et donc la perte des biofilms durant deux périodes d'incubation successives. Plusieurs améliorations des dispositifs de prélèvements ont alors été réalisées pour les rendre plus résistants aux frottements et à la vitesse de l'eau, améliorations grâce auxquelles toutes les campagnes suivantes ont pu être réalisées sans encombre.

3.1.3 Les sources naturelles Aixoises

La zone de recharge des sources thermales aixoises se situe sur la montagne de la Charvaz, sur la rive ouest du lac du Bourget. Ces eaux circulent jusqu'à 2200 m de profondeur tout en se dirigeant vers l'ouest. C'est pendant ce trajet qu'elles acquièrent leur caractère thermal. Elles utilisent ensuite les failles principales, situées au niveau d'Aix-les-Bains pour remonter en surface tout en finissant d'acquérir leur minéralisation (sulfates, calcium, chlorures, sodium, potassium). Au cours de cette remontée, les sulfates sont également réduits en sulfures du fait de l'activité bactérienne. La vitesse de remontée de cette eau est trop élevée pour permettre son retour à l'équilibre thermique avec le substrat environnant. Les sources Soufre et Alun, principales émergences de ce système karstique, sont donc des sources chaudes (Gallino, 2006).

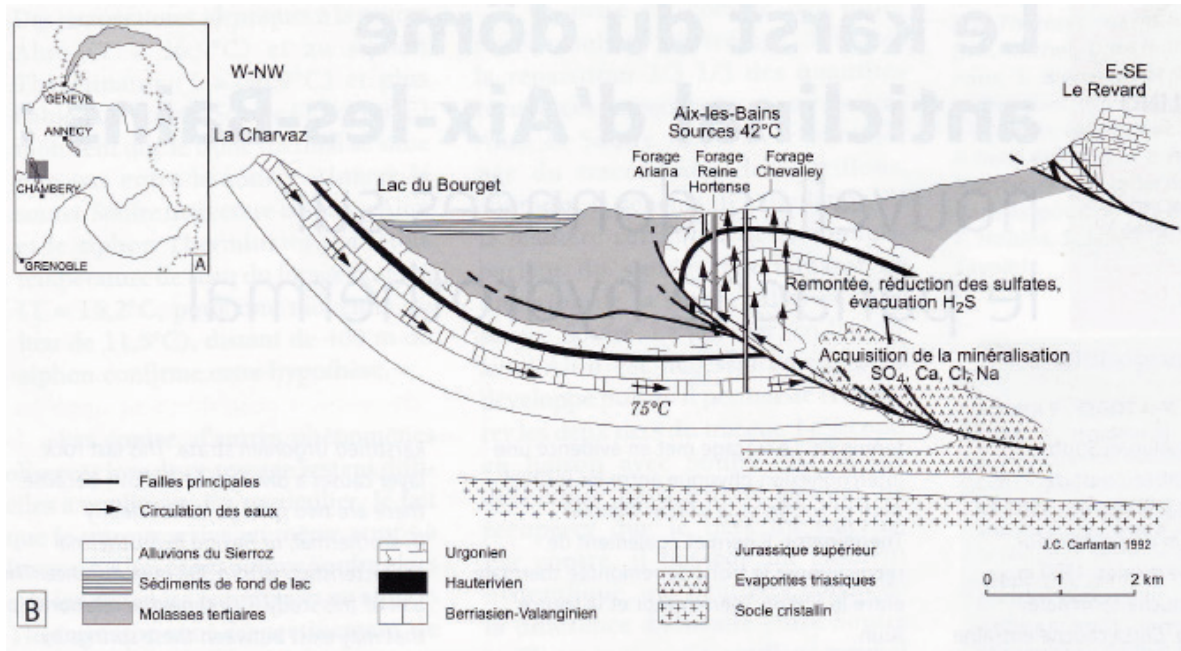


Figure 15: Schéma de circulation des eaux thermales d'Aix-les-Bains (Gallino, 2006)

Leurs températures d'émergence sont comprises entre 35 et 45°C selon la période et la source, avec une température légèrement plus élevée pour la source Alun. Ces sources sont également réactives aux événements pluvieux, leur débit peut, en effet, être multiplié par 3 ou 4, événements qui sont suivis, avec un délai, par les diminutions de leur température et de leur conductivité. L'amplitude de ces changements est plus importante au niveau de la source Alun que de la source Soufre. En profondeur, ces deux sources sont interconnectées entre elles et avec le siphon « Terminator » découvert lors de la construction des thermes Chevalley. Le siphon « Terminator » est aussi directement connecté à chacun des deux griffons, permettant la circulation des eaux depuis le siphon « Terminator » vers chaque griffon (Figure 16) (Gallino, 2006).

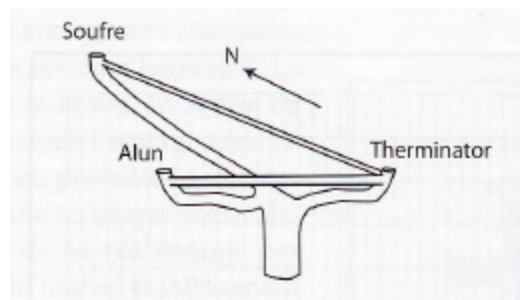


Figure 16: Schéma de circulation entre le siphon Terminator et les sources Soufre et Alun (Gallino, 2006)

Le fonctionnement hydrogéologique des sources thermales aixoises a fait l'objet de plusieurs études dont la plus récente (Gallino, 2006) fait état des caractéristiques physico-chimiques de l'eau des sources. Le pH a été mesuré ponctuellement au niveau de deux forages : il est de 7.2 dans le forage Chevalley et compris entre 6.8 et 7.3, avec une valeur médiane de 7.1, dans le forage du parc. Les eaux thermales ont un pH plus proche de la normalité et une conductivité plus forte que celle des cours d'eau (Tableau 6). Elles sont plus chargées pour les ions suivants : sodium, potassium, magnésium, calcium, strontium, chlorures et sulfates. On peut remarquer toutefois que l'eau de la rivière présente déjà de fortes concentrations en calcium. De plus, les nitrates sont rares ou absents dans les eaux thermales contrairement à l'eau des cours d'eau de surface.

Tableau 6: Caractéristiques physico-chimiques des eaux des sources thermales et de la rivière la Chaudanne entre le 15/08/2005 et le 15/08/2006 (Données S. Gallino)

	Alun			Soufre			Chaudanne		
	Médiane	min	max	Médiane	min	max	Médiane	min	max
Température (°C)	39.3	38	40.5	35	33.6	36.9	13.3	8	17.9
Conductivité (µS)	873	770	971	872	818	913	561	541	581
pH							8.02	8	8.24
Lithium (mg/L)	0.06	0	0.064	0.05	0.04	0.06	0	0	0.003
Sodium (mg/L)	36.4	28	39.34	35.5	31.1	39	7.83	5.5	10.46
Ammonium (mg/L)	0.43	0	1.933	0.3	0	1.38	0.33	0	0.95
Potassium (mg/L)	4.19	3.3	5.224	4.08	3.52	5.14	1.85	1.3	4.22
Magnésium (mg/L)	21.3	17	23.4	19.8	16.3	22.5	8.64	6.9	8.99
Calcium (mg/L)	131	115	141	127	115	136	103.8	92	107.16
Strontium (mg/L)	1.5	1.2	1.674	1.39	1.19	1.6	0.57	0.5	0.69
Hydrogénocarbonate (mg/L)	268	246	292.8	261	215	297	297.7	290	302.6
Fluor (mg/L)	1.09	0.7	1.58	1.02	0.84	1.36	0.1	0.1	0.12
Chlorures (mg/L)	26	18	28.08	31.1	22.1	36.6	10.9	9.5	12.07
Nitrites (mg/L)	0	0	0	0	0	1.26	0	0	0
Bromures (mg/L)	0	0	0.18	0	0	0.6	0	0	0
Nitrates (mg/L)	0	0	0.35	0.02	0	1.25	6.56	4.7	8.03
Phosphates (mg/L)	0	0	0.33	0	0	0.62	0	0	0.72
Sulfates (mg/L)	222	136	257	200	161	240	20.73	20	21.38

3.2 Dispositifs d'échantillonnage

Deux techniques d'échantillonnage des biofilms ont été utilisées au cours de cette étude. La première met en jeu des substrats artificiels. Il s'agit de la technique qui a été la plus utilisée dans les différents volets. L'utilisation de ces substrats artificiels a été validée par comparaison à la deuxième technique d'échantillonnage, qui consistait à prélever directement les biofilms présents sur les substrats naturels des cours d'eau.

3.2.1 Substrats artificiels

L'essentiel des prélèvements ont été effectués sur des substrats artificiels (Figure 17).

Il s'agit de lames de verre placées, chacune, dans un tube de polypropylène ouvert à ses deux extrémités. Cette disposition permet tout à la fois, le passage de l'eau, la colonisation de la lame et le développement du biofilm en milieu "ouvert". Elle présente l'avantage de ne pas mener à la formation de chemins préférentiels de circulation de l'eau et à la genèse de zones anaérobies.

L'utilisation de ces tubes comme support des lames peut toutefois être à l'origine d'artéfacts. Ils peuvent, en effet, jouer un rôle de protection du biofilm, en modifiant l'hydrodynamique de l'eau sur celui-ci, en diminuant par exemple l'importance des forces de cisaillement. De plus, lorsque de gros débris (fragments de branches, feuilles...) sont transportés par les cours d'eau, l'extrémité amont des tubes peut être obturée, limitant ainsi le passage de l'eau. L'orientation des tubes par rapport aux lignes de courant peut également changer au cours de l'incubation. Une orientation perpendiculaire aux lignes de courant amoindrit l'effet des changements de débits sur le biofilm. De plus, en raison de la nécessité de les fixer à la rive, les tubes sont souvent entraînés peu à peu vers la rive où ils sont alors abrités dans des zones hydrodynamiquement plus calmes. Dans ces zones, l'augmentation la vitesse de l'eau n'est d'ailleurs pas toujours proportionnelle à l'augmentation du débit dans la veine centrale.

Les lames utilisées sont des lames de microscopie dont la taille est de : 26 x 76 mm, soit une surface de colonisation de 3952 mm² par lame. A chaque campagne, des lames neuves sont utilisées. Les tubes sont attachés par 3 à l'aide de fil de pêche de 0.50 mm de diamètre (résistance : 3.90 kg). Pour la station Aquarium, le fil de pêche est remplacé par un fil d'acier tressé entouré d'une gaine de nylon (résistance 41 kg). Pour la station Liège, ce dispositif n'étant pas encore assez résistant, nous avons remplacé ces fils par des anneaux métalliques (Figure 18).

Deux groupes de 3 tubes sont attachés sur la rive de chacune des stations (à la végétation si cela est possible ou à un crochet dans les stations souterraines) avec de la cordelette d'escalade. L'accrochage des groupes de tubes à la cordelette s'effectue grâce à des émerillons. Pour les stations Liège et Aquarium, les contraintes physiques nous ont amenés à utiliser une cordelette de plus gros diamètre et à la protéger avec un tube en plastique. Pour qu'ils restent immergés, les groupes de tubes sont lestés par un plomb de pêche de 50 g.

Ces dispositifs étaient mis en incubation dans les cours d'eau pour une durée de 15 jours (dans le cas des volets "bassin versant" et "réseau aixois" de l'étude). Le choix de cette durée a été fait en fonction des résultats de tests préliminaires : la durée d'incubation des substrats devait être suffisamment longue pour permettre aux biofilms de se développer et d'atteindre un état proche de la maturité. A l'inverse, elle ne devait pas trop longue afin de réduire la probabilité de changements importants des conditions météorologiques au cours d'une même période d'incubation mais aussi afin de limiter les risques de dégradations (d'origine naturelle ou humaine) et de vol des dispositifs.

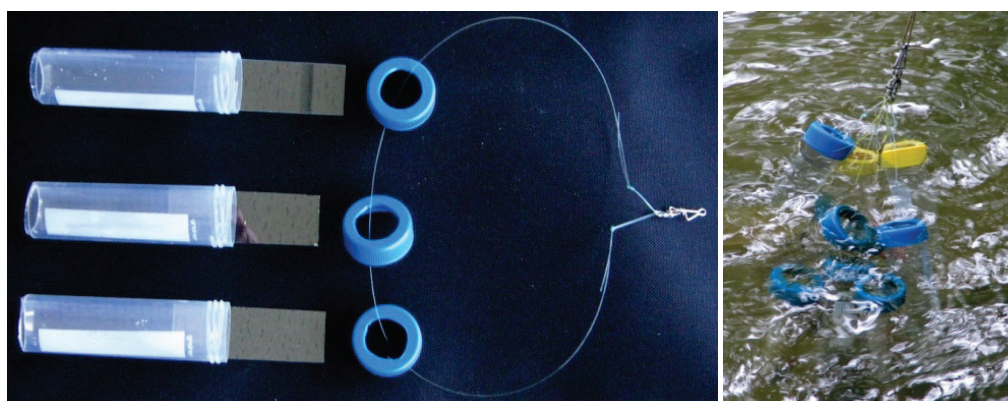


Figure 17: dispositif d'échantillonnage de biofilm par la technique des substrats artificiels.

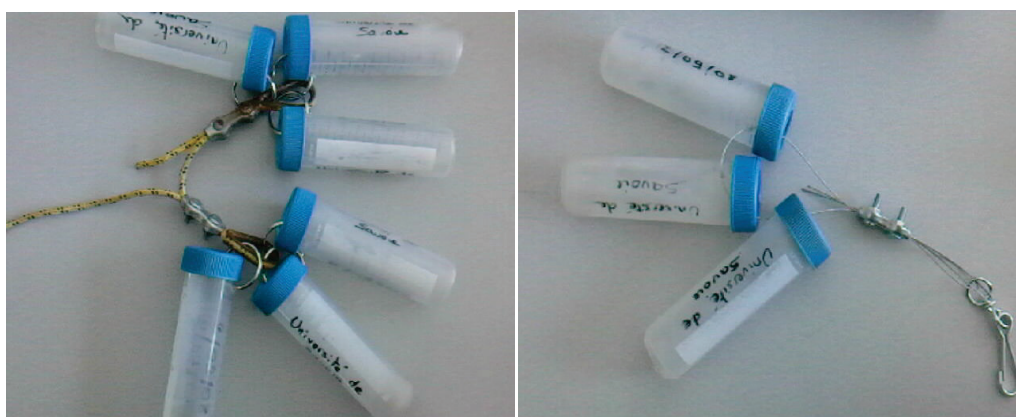


Figure 18: Améliorations apportées au dispositif d'échantillonnage pour les stations Aquarium (à gauche) et Liège (à droite).

Le choix de l'utilisation du verre, comme substrat artificiel, a été effectué en fonction des données bibliographiques. En effet, le verre permet un développement de biofilm à l'image des biofilms présents naturellement dans les cours d'eau, sans toutefois favoriser la présence de *Lpn* (Rogers, et al., 1994). Nous souhaitons, en effet, donner une image la plus juste de la présence de *Lpn* dans les biofilms de cours d'eau. De plus, l'absence de microporosité permet un bon décrochement du biofilm lors de l'étape de grattage du substrat et une meilleure évaluation de la surface de développement du biofilm que l'utilisation d'un galet. Enfin, l'utilisation du verre nous permet de rester dans la continuité de précédentes études effectuées au sein du laboratoire.

Malgré les inconvénients évoqués plus haut, le choix a été fait de disposer les tubes contenant les substrats artificiels à proximité des rives et non pas dans la veine centrale, essentiellement en raison des risques de perte par arrachage lors de gros débits, mais également pour des raisons pratiques vis-à-vis de la mise en place et du retrait des tubes.

Une fois récupérés, les biofilms, ramenés au laboratoire, étaient remis en suspension par grattage des lames de verre dans de l'eau du cours d'eau de la station correspondante, préalablement stérilisée par filtration sur filtre en fibre de verre de porosité 0.2 μm .

3.2.2 Substrats Naturels

Les biofilms développés sur les substrats naturels ont également été échantillonnées à trois reprises dans les stations du bassin versant du lac (Figure 19).

Chacun des dispositifs mis en œuvre a nécessité l'intervention de deux opérateurs.

Dans chacune des stations aériennes, un galet, où tout autre substrat de taille suffisante, était extrait du cours d'eau, puis placé sur le dispositif d'échantillonnage. Le système de grattage était ensuite fixé sur une zone suffisamment plane du galet.

Le système de grattage du biofilm est constitué des éléments suivants :

- une brosse en plastique dont la rotation est entraînée par une visseuse électrique réglée sur une vitesse de l'ordre de 80 t.min⁻¹.
- un cylindre en PVC de 32 mm de diamètre dans lequel se trouve la brosse, et d'où émerge la tige de fixation à la visseuse. L'extrémité du cylindre en contact avec le substrat est munie d'un joint (de diamètre interne 28 mm) afin de réaliser une étanchéité entre le substrat et le réservoir que constitue l'intérieur du cylindre. Le dispositif permet de gratter une surface de substrat bien définie, de 572.56 mm².
- un réseau de tubes grâce auxquels une circulation est établie entre le cylindre précédent et un pilulier contenant 50 ml d'eau déminéralisée stérile. La circulation d'eau est réalisée à l'aide d'une pompe péristaltique à main (pompe WAB) : l'eau du pilulier passe dans la pompe, puis est envoyée au niveau du cylindre de PVC où elle se charge de fragments de biofilms avant de retourner dans le pilulier. Malgré la présence d'un joint entre le substrat et le tube PVC, des pertes de suspensions de biofilms sont parfois observées principalement en raison des irrégularités de la surface du support naturel choisi. C'est la raison pour laquelle le volume final de suspension de biofilm récupérée dans le pilulier est mesuré exactement lors du retour au laboratoire.



Figure 19: Dispositif d'échantillonnage des substrats naturels (à droite: visualisation du biofilm par différence avec la zone échantillonnée). Les flèches représentent le sens de circulation de l'eau entre le pilulier et la zone du substrat échantillonnée.

Le dispositif d'échantillonnage précédent n'est pas adapté pour les prélèvements effectués sur les parois des buses en béton comme celle de la station Aquarium. Dans ces cas, un autre dispositif a été utilisé, constitué des éléments suivants (Figure 20) :

- un tube en plastique ouvert à une seule extrémité dans le fond duquel est insérée une brosse métallique,
- une pompe à vide à main,
- une seringue
- un flacon en polypropylène stérile

L'extrémité ouverte du tube en plastique était maintenue manuellement plaquée contre la surface immergée à échantillonner, un joint permettant d'assurer l'étanchéité entre le tube et l'eau environnante. Le substrat était gratté manuellement, là encore, sur toute la surface définie par le diamètre intérieur du tube, à l'aide de la brosse métallique. L'eau chargée du biofilm en suspension était ensuite aspirée dans le flacon à l'aide de la pompe à vide. Si nécessaire de l'eau peut être ajoutée à l'aide de la seringue, afin de renouveler le processus de grattage et de lavage. Le volume final de la suspension de biofilm était mesuré précisément lors du retour au laboratoire.



Figure 20: Dispositif de prélèvements des substrats naturels utilisé lors de la campagne de mai 2008 et mis en œuvre également à la station Aquarium.

Comme cela est visible sur la Figure 19, les dispositifs d'échantillonnage permettent de prélever efficacement le biofilm des substrats naturels. Nous faisons donc l'hypothèse que la quasi-totalité du biofilm est récupéré lors du brossage du substrat, même en présence d'irrégularités à la surface du substrat.

3.3 Réacteurs biologiques

Les réacteurs biologiques ont été mis en œuvre pour la réalisation de deux séries d'expériences. Ils ont été conçus pour suivre l'évolution de la composition de biofilms dans des conditions contrôlées de la température, de la vitesse d'écoulement et de la composition de l'eau. Les expériences réalisées visaient à étudier les effets sur les biofilms de changements de la vitesse de l'eau dans le cas de la première série d'expériences et de sa température dans le cas de la seconde série.

Chaque banc de réacteurs est constitué de 3 incubateurs cylindriques (Figure 21), chacun correspondant à un réplicat. Chaque incubateur est rempli en continu par le bas à l'aide de pompes et se vide par surverse grâce à un tube placé dans sa partie haute. Ce système permet de prévenir toute vidange intempestive des incubateurs en cas de panne d'une pompe. Chaque incubateur contient un carrousel équipé de dispositifs de maintien en position verticale de 10 lames (substrats artificiels) (Figure 22). La mise en rotation, à une vitesse définie, des carrousels et donc des biofilms, est réalisée à l'aide d'un système de poulies et de courroies qui relient leurs axes à un moteur.

Pour ces expériences, des substrats artificiels vierges (lames de verre) ont été disposés sur des portoirs puis mis à incuber dans la bêche de rejets des thermes Chevalley pendant 7 jours avant d'être récupérés et transférés dans les réacteurs. Par la suite, une lame est prélevée dans chacun des incubateurs (soit 3 lames ou un triplicat par banc) à un pas de temps spécifique aux différentes expériences.



Figure 21: Banc de réacteurs composé de 3 incubateurs (chacun d'entre eux représentant un réplicat).

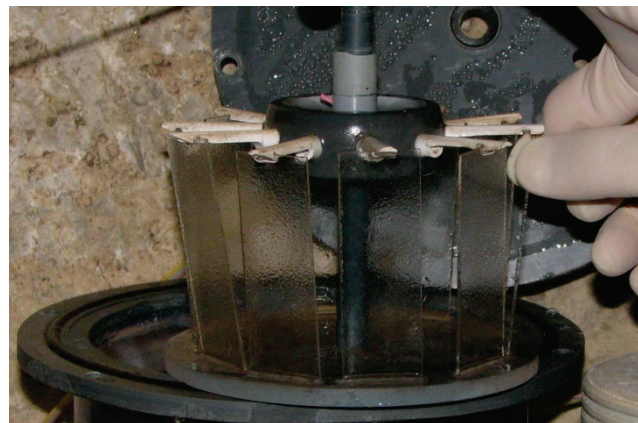


Figure 22: Carrousel supportant 10 substrats artificiels.

3.3.1 Expérience sur l'effet de la vitesse de l'eau

L'expérience a été réalisée en laboratoire. Les réacteurs, maintenus à l'obscurité à l'aide d'une bâche étaient alimentés avec de l'eau de la Leyse, en circuit fermé : l'eau ressortant des incubateurs était recueillie dans un cristalliseur commun permettant sa ré-oxygénation et son homogénéisation. L'alimentation des incubateurs par l'eau du cristalliseur était réalisée grâce à une pompe péristaltique. A chacun des jours du suivi, le système était tout d'abord commuté en circuit ouvert pour pomper l'eau de la Leyse prélevée le matin même. Une fois l'eau des 3 incubateurs entièrement renouvelée (en 1H30 environ), le système était de nouveau commuté en circuit fermé pour les 24 h qui suivent. Un débit constant était établi à la valeur de 1.5 l/h.

Les expériences ont été réalisées avec les deux vitesses de rotation des carrousels suivantes :

- 2 tr/min soit 1.05 cm/s
- 25 tr/min soit 13.1 cm/s

Les deux vitesses ont été testées successivement du fait de la disponibilité d'un seul banc de réacteurs. La composition des biofilms de départ, ainsi que la qualité de l'eau alimentant les réacteurs au cours de chaque expérience ont donc été différentes. Ces facteurs ont pu être responsables de réactions différentes face à un même changement de vitesse au cours des 3 expériences.

L'évolution des biofilms a été suivie par le prélèvement successif de chacun des 10 substrats colonisés au pas de temps suivant : J0, 1, 2, 4, 7, 9, 11, 14, 16 et 18. Le jour 0 correspond à la date du transfert des biofilms depuis la bache de rejet vers les réacteurs.

Chaque lame issue de chacun des réacteurs a été traitée séparément. L'eau utilisée pour remettre le biofilm en suspension était de l'eau de la Chaudanne filtrée à l'aide d'un filtre en fibre de verre de porosité 0.2 μm .

3.3.2 Expériences sur l'effet de la température de l'eau

Les deux bancs de réacteurs ont pu être utilisés simultanément dans le cadre des essais concernant l'étude de l'influence de la température de l'eau sur le développement des biofilms et plus particulièrement de *Lpn*. Ils ont été installés dans une galerie souterraine qui rejoint le lit de la Chaudanne entre les stations Mirabeau et Parking. Cette disposition a permis d'alimenter les réacteurs en circuit ouvert et directement à partir de l'eau de la Chaudanne. Les réacteurs étaient plongés par ailleurs, dans des conditions de température et d'obscurité identiques à celles des biofilms du fond du cours d'eau, lui aussi, essentiellement souterrain.

Le premier banc de réacteurs était directement alimenté en eau à partir de la Chaudanne et constituait le banc "rivière". L'eau d'alimentation du banc "rivière réchauffée", elle aussi en provenance de la Chaudanne, était préalablement réchauffée dans une cuve avant d'être répartie entre les 3 incubateurs. Ces derniers ne pouvaient pas être alimentés en continu du fait du temps de réchauffement mais leur eau était renouvelée d'un tiers toute les 15 minutes.

La vitesse de rotation à laquelle les biofilms ont été soumis durant ces essais a été fixée à la valeur la plus grande des tests relatifs à ce paramètre, soit 13.1 cm/s. Ce choix a été guidé par les résultats obtenus en amont sur l'effet de la vitesse de l'eau sur les biofilms.

Le fonctionnement de l'ensemble constitué par la cuve de chauffe et les pompes associées aux incubateurs, était géré sur la base de l'information de la température de l'eau du réservoir de chauffe ainsi que de chaque incubateur sur chacun des bancs ("rivière" et "rivière réchauffée"), enregistrée en continu à l'aide de sondes. Un automate a spécialement été conçu à cet effet par Michel Cuny et son équipe (IUT d'Annecy) et nous tenons à le remercier vivement ici.

Le système a connu plusieurs avatars tout au long des mois de son fonctionnement, principalement par le fait du colmatage de la crépine par des débris ou suite à son entartrage par la précipitation (intense ici) de carbonate de calcium. Lorsque cela se produisait, le remplissage de la cuve était insuffisant et l'automate arrêtaient l'ensemble pour le mettre en sécurité. Le renouvellement en eau des réacteurs était lui aussi suspendu afin que les biofilms restent immergés ce qui limitait les conséquences de l'arrêt sur leur développement. Une grille de protection contre les gros débris a été installée autour de la crépine, qui était régulièrement nettoyée (grattage + acide chlorhydrique) à chaque date de prélèvement. Mais ces deux précautions n'ont pas toujours été suffisantes.

La pompe servant à alimenter la cuve de chauffe en eau est également tombée en panne à plusieurs reprises.

Comme dans le cas de l'expérience consacrée à l'effet de la vitesse de l'eau, les biofilms étaient transférés dans les réacteurs après 7 jours de développement dans la bêche de rejet. Trois lames sont immédiatement récupérées pour constituer les triplicats à J0 à la fois pour les réacteurs "rivière" et "rivière réchauffée". Les autres lames sont réparties entre les 6 incubateurs (3 "rivière" et 3 "rivière réchauffée"). Les prélèvements dans chaque réacteur ont ensuite été effectués aux jours J1, 2, 3, 6, 8, 10, 13, 15, 17 et 20. Chaque lame colonisée a été analysée séparément. La mise en suspension du biofilm a été effectuée dans de l'eau de la Chaudanne filtrée (filtre en fibre de verre de porosité 0.2 μm).

L'augmentation de température initialement souhaitée était de +5°C, +10°C et +15°C par rapport à la température de la Chaudanne à la même période, mais l'analyse des mesures effectuées par les sondes a montré que l'augmentation réelle a en fait été de +4°C, +8°C et 12°C. Les tests n'ont pas été réalisés simultanément car nous ne disposions que d'un seul exemplaire de l'ensemble des bancs de réacteurs et du système de contrôle.

3.4 Descripteurs suivis

Les biofilms échantillonnés par la technique des substrats artificiels ont tout d'abord été mis en suspension dans 5 ml d'eau stérile. Chaque triplicat était constitué de 2 lames lors des prélèvements effectués dans les cours d'eau (volet bassin versant et volet Aix-les-Bains) tandis que lors des deux séries d'expériences en réacteurs, une seule lame a été utilisée par réplicat.

L'eau utilisée pour la mise en suspension du biofilm provient du cours d'eau échantillonné. Elle a été stérilisée par filtration sur un swinnex équipé d'un filtre en fibre de verre de porosité 0.2 μm .

Lors de leur récupération à chaque station, les biofilms sont placés dans des flacons plastiques stériles fermés (1 flacon par réplicat). Un volume d'eau stérile de 1 ml est ajouté dans chaque flacon afin de maintenir une atmosphère humide durant le retour au laboratoire. Pour leur transport, les flacons ainsi que les échantillons d'eau stérile sont placés dans une glacière à 4°C.

De retour au laboratoire, les deux faces de la (des) lame(s) de verre (d'un même réplicat) sont grattées manuellement, à l'aide d'une spatule, dans un pilulier. Les lames sont ensuite rincées à l'aide de 4 ml d'eau de rivière stérile. Le volume de 1 ml servant au cours du transport des échantillons est également ajouté. On obtient ainsi une suspension de biofilm d'un volume de 5 ml, quel que soit le nombre de lames grattées par réplicat.

Dans le cas des échantillonnages sur les substrats naturels, les échantillons rapportés sont des suspensions de biofilms. Leur volume est mesuré à l'aide d'éprouvettes.

Les mêmes analyses ont été effectuées sur les suspensions de biofilms quelle que soit leur origine (type de substrat). La plupart des descripteurs biologiques analysés sont communs à l'ensemble de l'étude. D'autres descripteurs sont spécifiques à chacun des volets, comme nous l'indiquerons plus loin.

Des analyses physico-chimiques de l'eau ont également été effectuées à partir de prélèvement réalisés durant la période d'incubation des substrats artificiels, aussi bien pour l'étude consacrée au bassin versant qu'à celle du réseau aixois.

3.4.1 Descripteurs biologiques

Avant chaque prélèvement dans la suspension de biofilms, cette dernière est homogénéisée pendant plusieurs secondes à l'aide d'un vortex. Nous avons préféré ce type d'homogénéisation à l'utilisation des ultra-sons car ces derniers peuvent détruire les ciliés et les amibes les plus fragiles (Hunt & Parry, 1998).

Le volume de suspension de biofilms utilisé varie avec l'objectif des analyses (l'astérisque indique que le descripteur n'a pas été mesuré dans l'ensemble des stations) :

- fixation en vue des marquages puis comptages en microscopie : Bactéries_{totales}, *Lpn*_{totales}, *Lpn*_{FISH}*, Amibes, Ciliés, Flagellés, *P. aeruginosa*_{FISH}*
- gamme de dilutions puis ensemencements : Bactéries_{Cultivables}, *Lpn*_{cultivables}, *P. aeruginosa*_{FISH}*
- congélation d'un volume de suspension : Poids sec/Matière Organique, PCR en temps réel*

3.4.1.1 Concentration des Bactéries_{totales}

La concentration des bactéries_{totales} est déterminée après leur marquage au DAPI (4',6'-diamidino-2-phénylindole). Il s'agit d'un intercalant de l'ADN qui se fixe spécifiquement au niveau des régions riches en Adénine et Thymine. Excité à une longueur d'onde de 365 nm, le complexe ADN-DAPI fluoresce en bleu brillant à 390 nm ou plus, tandis que le DAPI seul ou complexé à du matériel autre que de l'ADN fluoresce en jaune pâle. Ceci permet de distinguer facilement les bactéries des autres particules (Porter & Feig, 1980).

Un volume de suspension de biofilm compris entre 10 et 50 µl selon la charge de cette suspension est dilué dans 1 ml d'eau UHQ stérile, avant d'être fixé par l'ajout de formol (concentration finale 3.7%) pendant 48 h minimum à 4°C.

Le marquage est effectué sur une tourelle Millipore équipée d'un préfiltre en fibre de verre (AP20) et d'un filtre en polycarbonate noir de 25 mm de diamètre et de porosité 0.2 µm (Osmonic). L'ensemble de l'échantillon fixé, ou, si nécessaire un volume défini en fonction de sa charge particulaire, est déposé sur le filtre.

La solution de travail de DAPI, à une concentration finale de 10 µg/ml, est alors ajoutée.

L'ensemble est ensuite mis à incuber à température ambiante et à l'obscurité pendant 10 minutes.

L'échantillon est ensuite filtré, et le filtre rincé à l'eau distillée.

Chaque filtre est séché pendant au moins 5 minutes à température ambiante avant d'être monté entre lame et lamelle dans une goutte d'huile à immersion non fluorescente. La conservation des lames se fait à une température de -18°C, pendant plusieurs semaines, voire plusieurs mois.

Les bactéries sont ensuite dénombrées au microscope à épifluorescence (Nikon Eclipse TE200) avec l'objectif à immersion de grossissement x100, et le bloc de filtre UV-2A. Ce bloc contient un filtre d'excitation « passe-bande », qui laisse passer les longueurs d'onde comprises entre 325 et 375 nm, d'un miroir dichroïque ($\lambda > 400$ nm), et d'un filtre d'émission, de type passe-haut, qui laisse passer les longueurs d'ondes supérieures à 420 nm. Cinquante champs sont dénombrés.

La concentration en bactéries totales est déterminée grâce à la formule suivante :

$$N = \frac{X \times Sf \times Vs}{Sc \times Vf \times Sb}$$

Avec : N = nombre de bactéries par mm^2 de biofilm
 X = Nombre moyen de bactéries par champ
 Sf = Surface de filtration (mm^2)
 Vs = volume de suspension de biofilm après grattage (ml)
 Sc = Surface du champ (mm^2)
 Vf = Volume filtré (ml)
 Sb = Surface de biofilm échantillonnée (mm^2)

Ce marquage est effectué sur l'ensemble des échantillons de l'étude.

3.4.1.2 Concentration de Lpn_{totales}

Le dénombrement de Lpn_{totales} est effectué après leur marquage en immunofluorescence. Il s'agit d'une modification interne au laboratoire de l'utilisation du kit d'immunofluorescence habituellement utilisé pour identifier les colonies de Lpn .

Ce kit (Biorad) contient un anticorps monoclonal marqué à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) qui réagit avec un antigène de 29 kDa. Il permet un marquage spécifique au minimum des sérogroupes 1 à 15 de Lpn . L'intérêt d'utiliser un anticorps monoclonal est la rareté des marquages non-spécifiques. En effet, seules certaines souches de *Staphylococcus aureus* et de *Lactobacillus*, sont également marquées (Gosting, *et al.*, 1984, Helbig, *et al.*, 2006).

Lors du dénombrement en microscopie en épifluorescence, Lpn apparaît d'une couleur vert-pomme brillant tandis qu'un contre-colorant permet de marquer les autres organismes en rouge.

Pour ce marquage, 10 à 20 μl de suspension de biofilm sont dilués dans 1 ml d'eau UHQ stérile puis fixée au formaldéhyde pour une durée de 24 h au maximum à 4°C. Des tests effectués au laboratoire ont montré que cette étape de fixation au formaldéhyde permettait une meilleure efficacité de marquage des Lpn_{totales} , pouvant s'expliquer par un meilleur accès aux antigènes ciblés par cette méthode. L'ensemble de l'échantillon fixé, ou un volume défini en fonction de la charge, est ensuite filtré sur un filtre en polycarbonate blanc de 25 mm de diamètre et de 0.2 μm de porosité (Osmonics). Le filtre est ensuite rincé au PBS (pH 7.6) puis conservé à -18°C pendant plusieurs semaines avant le marquage. Seul ¼ de filtre est utilisé pour ce marquage, le reste du filtre peut servir à d'autres marquages (FISH par exemple).

Le ¼ de filtre est recouvert de réactif anti-*Legionella pneumophila* (sérogroupes 1 à 15) dilué au 1/5^{ème}, puis placé dans une chambre humide et incubé pendant 45 min à 37°C. L'excès de colorant est éliminé puis le ¼ de filtre est rincé pendant 5 minutes dans du tampon PBS (pH = 7.6) avant d'être séché à l'air libre.

Une fois sec, le filtre est monté entre lame et lamelle dans une goutte de citifluor (1,4-Diazabicyclo[2,2,2]octane ou DABCO 0.026g/ml ; Tris 1M pH8 200 μl , glycérol 9ml). Les lames peuvent être conservées à 4°C pendant quelques heures uniquement, avant leur dénombrement au microscope en épifluorescence (Nikon Eclipse TE200).

Le FITC présente un maximum d'excitation et d'émission pour les longueurs d'onde de 495 et 519 nm respectivement. Le bloc de filtres utilisés est le bloc B-2A, dont les caractéristiques sont les suivantes :

- filtre d'excitation passe-bande pour les longueurs d'onde comprise entre 450 et 490 nm,
- un miroir dichroïque ($\lambda > 505$ nm),
- un filtre d'émission passe-haut pour les longueurs d'ondes supérieures à 515 nm.

La concentration de Lpn_{totales} est obtenue à l'aide de la formule suivante :

$$Lpn = \frac{Y \times Sf \times Vs}{Sc \times Vf \times Sb}$$

Avec : Lpn = nombre de Lpn_{totales} par mm^2 de biofilm
 Y = Nombre moyen de Lpn_{totales} par champ
 Sf = Surface de filtration (mm^2)
 Vs = volume de suspension de biofilm après grattage (ml)
 Sc = Surface du champ (mm^2)
 Vf = Volume filtré (ml)
 Sb = Surface de biofilm échantillonnée (mm^2)

3.4.1.3 Concentration en Lpn_{FISH}

Les dénombrements de Lpn par la technique dite "Fluorescence In Situ Hybridization" ou "FISH" est effectuée selon le protocole de Grimm (1998). La sonde utilisée est la sonde Legpne1 dont la séquence est 5'-ATC TGA CCG TCC CAG GTT-3'. Cette sonde est complémentaire d'un domaine variable de l'ARNr 16S de Lpn (Grimm, *et al.*, 1998). L'extrémité 5' de la sonde est couplée à un fluorochrome, il s'agit dans notre cas de la carbocyanine (Cy3) dont les pics d'absorption et d'émission sont respectivement observés à 552 nm et à 565 nm.

Le marquage FISH est effectué sur un autre quart du filtre en polycarbonate blanc utilisé par ailleurs pour le marquage en immunofluorescence.

Le quart de filtre est recouvert de 19 μl de tampon d'hybridation préchauffé à 48°C (NaCl 0.9 M, TrisHCl 20 mM, Formamide 20%, SDS 0.01%, sonde 100 ng/ μl) puis inséré dans une chambre d'incubation dont les puits sont remplis avec du tampon d'hybridation ne contenant pas de sonde. Les chambres d'hybridation sont alors placées à l'étuve à 46°C pendant 2 h.

Le surplus de tampon d'hybridation est ensuite éliminé en déposant le quart de filtre sur du papier absorbant. Le quart de filtre est ensuite plongé dans un tube contenant le tampon de rinçage préchauffé (NaCl 450 mM, TrisHCl 20 mM, EDTA 5 mM, SDS 0.01%) et placé dans un bain marie à 48°C pendant 30 min.

Le quart de filtre est alors séché sur du papier absorbant avant d'effectuer le double marquage au DAPI.

Une solution de DAPI (0.01%) est déposée sur le filtre qui est ensuite mis à incuber à l'obscurité, à température ambiante, pendant 15 minutes. Le filtre est rincé pendant 30 secondes dans une solution d'alcool (éthanol 70°) puis déposé sur une feuille de papier absorbant. Une fois sec, le filtre est monté entre lame et lamelle dans une goutte de citifluor, puis conservé ainsi pendant quelques heures à -18°C.

Le dénombrement des Lpn marquées en FISH se fait en deux étapes.

Les lames sont tout d'abord observées au microscope à épifluorescence (Nikon® Eclipse) équipé d'une caméra numérique (Nikon®, DMX1200) et d'un logiciel permettant la prise de photo (Lucia™). Chaque champ est photographié en présence des filtres du bloc Cy3 (Nikon®), puis du bloc de filtres UV-2A (Nikon®). Le bloc Cy3 (Nikon®) est équipé d'un filtre d'excitation passe-bande pour les longueurs d'ondes comprises entre 530 et 560 nm, d'un miroir dichroïque passe-haut pour les longueurs d'ondes supérieures à 570 nm et d'un filtre d'émission passe-bande pour les longueurs d'ondes comprises entre 573 et 648 nm. Ce bloc permet de visualiser les bactéries marquées en FISH, tandis que la photographie du même champ avec le bloc UV-2A (Nikon®), permet de visualiser l'ensemble des bactéries marquées au DAPI. Cinquante champs sont ainsi photographiés aléatoirement sur le filtre.

La deuxième étape de ce dénombrement est l'analyse des photographies à l'aide du logiciel Adobe Photoshop®. Les deux photographies correspondant à un même champ sont ouvertes simultanément. Leur contraste ainsi que leur luminosité sont ajustés. Puis chaque *Lpn* est identifiée et comptée uniquement lorsqu'une cellule est marquée à la fois sur la photographie du FISH et du DAPI.

La concentration de Lpn_{FISH} est alors déterminée grâce à la formule suivante :

$$Lpn\ FISH = \frac{Z \times Sf \times Vs}{Sc \times Vf \times Sb}$$

Avec : $Lpn\ FISH$ = nombre de Lpn_{FISH} par mm^2 de biofilm
 Z = Nombre moyen de Lpn_{FISH} par champ
 Sf = Surface de filtration (mm^2)
 Vs = volume de suspension de biofilm après grattage (ml)
 Sc = Surface du champ (mm^2)
 Vf = Volume filtré (ml)
 Sb = Surface de biofilm échantillonnée (mm^2)

Ce marquage n'a pas été effectué au cours des expériences en réacteurs visant à évaluer les effets de la vitesse et de la température.

3.4.1.4 Concentrations de *Pseudomonas*_{FISH} et des bactéries apparentées

Dans le cadre des échantillons provenant des 5 stations du réseau hydrographique aixois (volet II), nous nous sommes également intéressés aux bactéries appartenant à l'espèce *P. aeruginosa*. Leur dénombrement s'est effectué à l'aide d'un marquage en FISH.

Parmi les nombreuses sondes spécifiques existantes, notre choix s'est arrêté sur la sonde "Psaer16S-182". Il s'agit d'une sonde ciblant l'ARN 16S, décrite par Wellinghausen *et al.* en 2005, qui a pour séquence 5'-CCA CTT TCT CCC TCA GGA CG-3'. Les auteurs lui accordent une meilleure sensibilité que la sonde PsaerA décrite en 2000 par Hogardt. Elle est donnée pour être spécifique de *P. aeruginosa* car elle ne marque pas des espèces telles que *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas stutzeri*, *Acinetobacter junii* ou *Sphingomonas paucimobilis*. Sa spécificité est cependant toute relative car elle marque les bactéries d'autres espèces de pseudomonas (*P. fluorescens*, *P. musselii*, *P. pseudoalcaligenes*, *P. citronellolis*) et même d'autres genres bactériens tels qu'*Acinetobacter* ou *Klebsiella pneumoniae*. De ce fait nous utiliserons l'expression "Pseudomonas et bactéries apparentées" dans la suite du manuscrit, pour désigner les bactéries dénombrées à l'aide de cette sonde.

Le protocole est identique à celui utilisé pour *Lpn*, seules changent les concentrations des tampons ainsi que la durée d'incubation. Le tampon d'hybridation auquel est ajoutée la sonde est composé de NaCl (0.9 M), de TrisHCl (20 mM), de formamide (40%) et de SDS (0.01%). L'hybridation est plus rapide que dans le cas de *Lpn*, car 1 h suffit à une température de 46°C. Les concentrations des différents composants du tampon de rinçage changent également : NaCl (46 mM), TrisHCl (20 mM), EDTA (5 mM), SDS (0.01%).

L'extrémité 5' de la sonde est également modifiée avec le fluorochrome Cy3. Le dénombrement au microscope s'effectue de la même manière que pour *Lpn*, en utilisant les mêmes filtres.

3.4.1.5 Concentrations des bactéries_{totales cultivables}

En fonction de la saison et de la station, la gamme de dilution (1/10) effectuée est variable : elle peut aller jusqu'à une valeur de 10^{-6} . Toutes les dilutions sont effectuées dans 1.8 ml de sérum physiologique (NaCl 6‰).

Seules les 3 dilutions les plus fortes sont utilisées pour la détermination de la concentration des bactéries cultivables. Pour cela, un volume 200µl de chacune de ces dilutions estensemencé sur une gélose TSA (Trypton Soja Agar, Oxoid®). Le milieu TSA est un milieu de culture généraliste qui convient à la croissance d'un grand nombre de microorganismes, en raison de la présence de deux qualités de peptone (Tableau 7). Nous dénombrons ainsi les bactéries hétérotrophes aérobies cultivables.

Tableau 7: Composition du milieu TSA

	Concentration (g/l)
Hydrolysate pancréatique de caséine	15
Hydrolysate enzymatique de soja	5
NaCl	5
Agar	15
pH = 7.3 ±0.2 à 25°C	

Les boîtes de cultures sont ensuite placées à l'étuve à 25°C pendant 4 jours. Seules les boîtes contenant entre 20 et 100 colonies sont ensuite comptées.

La concentration des bactéries_{cultivables} est alors déterminée à l'aide de la formule suivante :

$$N_{cult} = \frac{X_c \times V_s}{V_e \times d \times S_b}$$

Avec : N_{cult} = concentration de bactéries_{cultivables} (UFC/mm² de biofilm)

X_c = Nombre de colonies

V_s = volume de suspension de biofilm après grattage (ml)

V_e = Volumeensemencé (ml)

d = Facteur de dilution

S_b = Surface de biofilm échantillonnée (mm²)

3.4.1.6 Concentration de *Lpn*_{cultivables}

Le dénombrement de *Lpn*_{cultivables} suit la norme AFNOR NF T90-431 pour les eaux sales. Il consiste en un traitement combiné des échantillons (traitement thermique suivi par un traitement acide visant à limiter le développement de la flore annexe), suivi de l'ensemencement sur un milieu sélectif. Ce traitement est nécessaire dans le cas de biofilms de cours d'eau. Dans certains échantillons, une flore annexe très importante reste présente malgré l'application du traitement combiné.

Trois dilutions sont utilisées, il s'agit des dilutions : 0, 10^{-1} et 10^{-2} pour les échantillons environnementaux mais des dilutions plus importantes peuvent être utilisées lors des expérimentations en réacteurs (expériences sur la vitesse et la température).

Les tubes de dilution 10^{-1} et 10^{-2} ainsi qu'un tube contenant 500 µl de suspension de biofilm non diluée sont placés au bain marie à 50°C pendant 30 min. A la sortie du bain marie, le tampon acide (pH =2.0 ; HCl=10.5 mmol/l ; KCl=190 mmol/l, ajustement du pH avec KOH 1 mol/l) est ajouté dans chaque tube, à un volume égal à celui présent dans le tube. Le temps de contact est de 5 minutes. Le traitement acide ajoute donc un facteur de dilution de 0.5.

200 µl de chacune des dilutions de la suspension traitée sont ensemencées sur une boîte de milieu GVPC (Tableau 8) et mis à incuber à 37°C pendant 8 à 10 jours.

Tableau 8 : Composition du milieu GVPC utilisé pour le dénombrement des *Lpn*_{cultivables}

	Concentration (g/l)
Extrait de levure	10.00
Chlorhydrate de cystéine	0.40
Pyrophosphate de fer	0.25
α -cétoglutarate	1.00
Charbon actif	2.00
Tampon ACES	10.00
Agar	15.00
Sélectivité du milieu obtenue grâce à l'ajout d'antibiotiques :	
Polymyxine B	100 000 UI/l
Vancomycine	1 mg/l
Cycloheximide	80 mg/l
Glycine	3 g/l

La détermination des colonies de *Lpn* est d'abord effectuée sous une loupe binoculaire. Les colonies suspectes sont ensuite testées dans des lames à puits par un marquage en immunofluorescence à l'aide du kit Monofluo *Lpn* IFA (Biorad®), selon les indications du fournisseur.

En cas de résultat positif, le sérotype de la colonie concernée est partiellement déterminé grâce au test d'agglutination au latex (Oxoid®). Ce test nous permet d'identifier les colonies appartenant au sérotype 1, au sérotype 2 à 14, et au sérotype 9 dans le cas d'une réaction positive avec les 2 réactifs (1 et 2-14). Pour cela, une goutte de réactif (sg 1 ou sg 2-14) est placée sur une carte où sera effectuée la réaction. Une goutte de tampon de dilution (PBS, pH 7.3) est également déposée, elle ne doit pas être mélangée au réactif déposé dans la première étape. Un fragment de la colonie à tester est mélangé au tampon de dilution. Le tout est ensuite mélangé au réactif. Le mélange se poursuit par un mouvement circulaire infligé à la carte. Le test est positif, lorsque l'agglutination des particules de latex bleues est observée.

Comme pour les bactéries_{cultivables}, la concentration de *Lpn*_{cultivables} est déterminée à partir de la formule suivante :

$$Lpn\ cult = \frac{Xc \times Vs}{Ve \times d \times Sb}$$

Avec : *Lpn cult* = concentration en *Lpn* cultivables (UFC/mm² de biofilm)

Xc = Nombre de colonies

Vs = volume de suspension de biofilm après grattage (ml)

Ve = Volumeensemencé (ml)

d = Facteur de dilution (tient compte de la dilution engendrée par le traitement acide)

Sb = Surface de biofilm échantillonnée (mm²)

3.4.1.7 Concentration de "*Pseudomonas*_{cultivables} et des bactéries apparentées"

Les prélèvements effectués sur le réseau aixois ont également fait l'objet de dénombrements de la forme cultivable de *P.aeruginosa* sur la base d'une culture sur milieu au cétrimide et à l'acide nalidixique. Aucune vérification complémentaire de la présence effective de *P. aeruginosa* parmi les colonies apparues sur les boîtes de Pétri (par des cribles biochimiques ou moléculaires) n'a été faite. Comme dans le cas de la technique FISH, les dénombrements effectués doivent donc être considérés comme ceux des formes cultivables de bactéries du genre *Pseudomonas* et de bactéries apparentées. Nous utiliserons donc une formule équivalente pour les désigner dans la suite du manuscrit.

Un volume de 200 µl des plus petites dilutions (0, 10⁻¹ et 10⁻²) estensemencé directement sur une gélose au cétrimide et à l'acide nalidixique (Tableau 9) avant d'être placé à l'étuve à 42°C pendant 48 h. L'incubation à 42°C améliore la spécificité du milieu (Brown & Lowbury, 1965).

Tableau 9 : Composition du milieu de culture utilisé pour le dénombrement des "*Pseudomonas*_{cultivables} et bactéries apparentées"

	Concentration (g/l)
Peptone de gélatine	16.0
Hydrolysate de caséine	10.0
Sulfate de potassium	10.0
Chlorure de magnésium	1.4
Agar	11.0
pH = 7.1 ±0.2	
Sélectivité du milieu pour <i>P. aeruginosa</i>	
Cétrimide	0.2
Acide nalidixique	0.015

Les colonies se développant sur les boîtes sont ensuite dénombrées. La concentration de "*Pseudomonas*_{cultivables} et bactéries apparentées" est alors déterminée à partir de la formule suivante :

$$P. aer cult = \frac{Xc \times Vs}{Ve \times d \times Sb}$$

Avec : *P.aer cult* = concentration de *Pseudomonas*_{cultivables} et bactéries apparentées (UFC/mm² de biofilm)

Xc = Nombre de colonies

Vs = volume de suspension de biofilm après grattage (ml)

Ve = Volumeensemencé (ml)

d = Facteur de dilution

Sb = Surface de biofilm échantillonnée (mm²)

3.4.1.8 Concentration en *Lpn* déterminée par Q-PCR

Sur les échantillons provenant du bassin versant (volet I), la concentration de *Lpn* est aussi déterminée par la technique de PCR quantitative (PCR en temps réel) grâce au GenExtract (Figure 23) et au GeneDisc Cycler (GeneSystem®). Pour cela 1 ml de suspension de biofilm est placé dans un tube Eppendorf puis conservé à -18°C jusqu'à l'extraction. La conservation peut durer de quelques jours à quelques semaines.

Pour l'extraction, 1 ml de suspension de biofilm est placé dans un tube contenant le tampon de lyse (pack eaux sales). Les tubes sont placés dans un bac à ultrason pendant 20 min (250W, 40 kHz) puis au bain marie (150°C) pendant 10 minutes.

Le contenu des tubes est ensuite versé sur des colonnes de filtration permettant d'éliminer les gros débris. Le filtrat obtenu est ensuite centrifugé pendant 4 min à 2500 g. Le surnageant est alors mélangé à 2 ml de tampon de liaison et à 2 ml d'éthanol absolu et vortexé pendant 30 sec.

Puis le contenu des tubes est versé sur des colonnes de silice dont le rôle est de retenir l'ADN. Les colonnes sont lavées à l'aide de 2 et 4 ml de chacun des tampons de lavage, puis séchées pendant 20 minutes.

Les extraits d'ADN sont ensuite récupérés à l'aide de tampon d'élution préchauffé à 70°C. L'extrait recueilli (~200 µl) est transféré dans un tube Eppendorf et placé à -18°C jusqu'à l'amplification.



Figure 23 : GeneExtract équipé des cylindres de filtration.

L'amplification s'effectue à l'aide de GeneDisc et du GeneDiscCycler (Figure 24). Les puits du GeneDisc contiennent une fine galette contenant l'enzyme, les amorces ainsi que les nucléotides.



Figure 24: GeneDisc vu de dessus (à gauche) et GeneDisc cyclé (à droite).

Le disque possède 6 secteurs analytiques :

- les 5 premiers reçoivent les extraits des différents échantillons,
- le 6^{ème} secteur est un contrôle négatif : l'extrait inséré correspond au témoin d'extraction.

Chaque secteur comprend 6 puits contenant chacun les primers spécifiques à la détection de *Lpn* ainsi que la sonde fluorescente permettant la quantification de l'ADN (FAM[6-carbofluorescein]-TAMRA[6-carboxytetramethylrhodamine]) :

- les 2 premiers puits sont des contrôles positifs : ils servent à la détection d'inhibiteurs internes à l'échantillon. Ils contiennent en plus, une séquence synthétique d'ADN dont chaque extrémité présente la séquence spécifique aux amorces utilisées.
- 3 autres puits permettent la détection et la quantification de *Lpn*.
- le dernier puits est un contrôle négatif de la PCR, ce puits ne possède pas d'amorces.

L'extrait d'ADN est mélangé à un « Mix » avant d'être placé dans un des secteurs au centre du GeneDisc, puis d'être réparti dans chacun des puits. La répartition dans les puits s'effectue par la formation puis la rupture d'un vide au niveau de la zone centrale du GeneDisc. De l'huile est également ajoutée dans chaque puits de la même manière.

Le disque est ensuite inséré dans le GeneDiscCycler et l'analyse peut être lancée. Le disque va tourner de manière régulière en passant successivement sur les 3 secteurs chauffant. Le disque effectue d'abord un cycle à 92°C afin d'activer l'enzyme dans chacun des puits, puis il effectuera 45 cycles sur chacun des 3 secteurs: 94°C ; 52°C puis 54°C, la taille des secteurs chauffants ainsi que la vitesse de rotation constante du disque permet de définir la durée correspondant à chacune des températures.

La concentration de *Lpn* est ensuite déterminée à partir des courbes d'évolution de la fluorescence et du nombre de cycles à partir duquel on sort de la zone du bruit de fond (Ct). Ceci est effectué à l'aide d'une macro-commande développée par GeneSystem dans le logiciel Excel®.

La limite de détection en PCR est de 167 UG/L, tandis que la limite de quantification est 833 UG/L (Yaradou, *et al.*, 2007). La limite de détection correspond au plus petit UG donnant un résultat positif dans 90% des "runs", alors que la limite de quantification correspond au plus petit nombre d'UG donnant un coefficient de variation inférieur à 25% (Yaradou, *et al.*, 2007).

3.4.1.9 Dénombrement des protistes

Les protistes ont été dénombrés à l'aide des techniques classiquement utilisées au laboratoire.

3.4.1.9.1 Flagellés

Un volume de 250 µl de suspension de biofilm est fixé avec 63 µl de glutaraldéhyde puis conservé à 4°C. Les flagellés sont ensuite marqués à la primuline avant filtration sur des filtres en polycarbonate noirs de 25 mm de diamètre et de porosité 0.8 µm (Osmonics). Les filtres sont ensuite montés entre lame et lamelle dans une goutte d'huile à immersion et conservés à -18°C jusqu'au comptage au microscope en épifluorescence (Nikon® Eclipse TE200) grâce au bloc de filtres B-2A précédemment utilisés pour les dénombrements en immunofluorescence (Lpn_{totales}). Lorsqu'ils sont excités sous UV, les flagellés marqués à la primuline fluorescent d'un blanc bleuté. Cette fluorescence est maintenue lors d'une excitation dans le bleu, mais elle est masquée par la fluorescence de la chlorophylle a des flagellés autotrophes (fluorescence rouge). La différence de fluorescence permet de dénombrer à la fois les formes autotrophes et les formes hétérotrophes (Caron, 1983).

$$Flag = \frac{X \times Sf \times Vs}{Sc \times Vf \times Sb}$$

Avec : *Flag* = nombre de flagellés par mm² de biofilm
X = Nombre moyen de flagellés par champ
Sf = Surface de filtration (mm²)
Vs = volume de suspension de biofilm après grattage (ml)
Sc = Surface du champ (mm²)
Vf = Volume filtré (ml)
Sb = Surface de biofilm échantillonnée (mm²)

3.4.1.9.2 Ciliés et amibes

Un volume de 1.25 ml de suspension de biofilm est fixé avec 420 µl d'HgCl saturé (40 mg.L⁻¹) et conservé à 4°C jusqu'au dénombrement. Jusqu'à 100 µl d'échantillon fixé sont placés dans une cuve d'Utermohl et mis à décanter pendant une nuit. Les ciliés et amibes sont ensuite dénombrés au microscope inversé en lumière transmise (Nikon Eclipse TE200)(Sime-Ngando, *et al.*, 1990). Le dénombrement suit celle définie par Utermohl (1958).

La concentration en ciliés et en amibes est alors déterminée grâce à la formule suivante :

$$Ciliés, Amibes = \frac{X \times Sf \times Vs}{Sc \times Vf \times Sb}$$

Avec : *Ciliés, Amibes* = nombre de ciliés ou d'amibes par mm² de biofilm
X = Nombre moyen de ciliés ou d'amibes par champ
Sf = Surface de filtration (mm²)
Vs = volume de suspension de biofilm après grattage (ml)
Sc = Surface du champ (mm²)
Vf = Volume filtré (ml)
Sb = Surface de biofilm échantillonnée (mm²)

3.4.2 Paramètres physico-chimiques

Les analyses physico-chimiques ont été effectuées soit sur les biofilms échantillonnés (poids sec et matière organique) soit sur des échantillons d'eau prélevés à chaque station au cours de la période d'incubation des biofilms (concentrations ioniques, COD, température, pH et conductivité). A cela s'ajoutent des mesures du débit du cours d'eau.

Les prélèvements d'eau sont effectués à l'aide d'un préleveur automatique (Isco ®). Le préleveur est placé successivement à chaque station pendant une durée de 24 heures. Il permet d'effectuer un prélèvement d'eau d'un même volume tous les ¼ d'heure. Le volume de chaque prélèvement varie en fonction de la station car il dépend de la différence de hauteur entre le préleveur et la rivière. Après 24 heures, 5 litres d'eau sont récupérés et placés à 4°C jusqu'au retour au laboratoire.

Le préleveur est alimenté grâce à une batterie (12V, 640A) qui doit être rechargée toutes les 48 h, c'est-à-dire toutes les 2 stations. Ceci va donc engendrer un décalage dans le temps des prélèvements à chaque station. Ce décalage peut atteindre 14 jours au maximum entre la première et la dernière station échantillonnée dans le cas du bassin versant. Mais le prélèvement est toujours effectué pendant la période de développement des biofilms.

3.4.2.1 Poids sec et fraction organique du biofilm

Chaque filtre (Fibre de verre, diamètre 25 mm, porosité 0.7 µm) a été brûlé à 550°C pendant 1h avant d'être placé au dessiccateur. Le poids du filtre (P_{filtre}) est ainsi mesuré à l'aide d'une balance de précision.

Un volume compris entre 0.5 et 1.75 ml de suspension de biofilm a été filtré. Les filtres ont ensuite été mis à sécher à 110°C à l'étuve pendant une nuit, puis placés au dessiccateur avant leur pesée (=P1).

Le poids sec du biofilm est alors déterminé grâce à la formule suivante :

$$\text{Poids sec} = \frac{(P1 - P_{\text{filtre}}) \times V_s}{V_f \times S_b}$$

Avec : $P1$ = Poids du filtre après passage à l'étuve (mg)
 P_{filtre} = poids du filtre prébrûlé (mg)
 V_s = Volume de suspension de biofilm après grattage (ml)
 V_f = Volume filtré (ml)
 S_b = Surface de biofilm échantillonnée

Une fois pesés, les filtres ont été brûlés à nouveau à une température de 550°C pendant 1 h afin d'éliminer la matière organique du biofilm. Ils ont ensuite été placés au dessiccateur jusqu'à une nouvelle pesée (P2).

Il est alors possible de déterminer le poids sec de matière organique dans le biofilm à l'aide de l'équation suivante :

$$\text{Poids sec matière organique} = \frac{(P1 - P2) \times Vs}{Vf \times Sb}$$

Avec : $P1$ = Poids du filtre après passage à l'étuve (mg)
 $P2$ = Poids du filtre après 1 h à 550°C
 Vs = Volume de suspension de biofilm après grattage (ml)
 Vf = Volume filtré (ml)
 Sb = Surface de biofilm échantillonnée

Cette mesure est la seule analyse physico-chimique effectuée directement sur la suspension de biofilm.

Lors de la construction du modèle, des mesures de transport de charge ont été effectuées (chapitre 9.2.1). Pour cela, un filet à dérive (maille : 2 µm) a été placé dans le cours d'eau, à égale distance des rives et en prenant soin de vérifier qu'il soit totalement immergé. Le temps d'exposition au courant est déterminé en fonction des conditions hydrologique du moment. Il est de l'ordre de quelques heures. Les filets utilisés mesurent 50 cm de long pour 20 cm de diamètre. Ils ont été fabriqués par l'entreprise Diatex (St-Genis-Laval, France) spécialement pour notre étude.

Les matériaux récoltés sont filtrés. Leur concentration en matières minérales et en matières organiques a ensuite été déterminée selon la méthode décrite précédemment.

3.4.2.2 Dosage du Carbone Organique Dissous (COD)

Pour le dosage du COD, 15 ml d'eau ont été filtrés à l'aide d'une seringue en verre équipée d'un filtre millex GV de porosité 0,2 µm (Millipore) préalablement rincé à l'eau UHQ. L'eau filtrée a ensuite été conservée dans des piluliers préalablement brûlés puis placée à -18°C jusqu'au dosage.

Le dosage est effectué avec un analyseur de carbone (Labtoc[®], Pollution and Process Monitoring). L'échantillon est d'abord acidifié afin de supprimer les carbonates inorganiques. Puis il subit un bullage à l'azote (N₂) avant d'être injecté dans le Labtoc[®]. Le COD est ensuite oxydé sous les effets conjoints d'une solution de persulfate de potassium et d'UV. Cette réaction produit du CO₂ dosé en aval par spectrométrie infrarouge. La comparaison à une courbe de calibration permet de déterminer la concentration en COD de l'échantillon (Viboud, 2003, Comte, *et al.*, 2006).

3.4.2.3 Dosage des ions majoritaires

Deux sous-échantillons de 1 ml d'échantillon d'eau ont été placés dans des microtubes et conservés à -18°C jusqu'à analyse. Le dosage des ions majeurs a ensuite été effectué par chromatographie ionique (CIA, Waters).

Le dosage des ions phosphates est effectué dès le retour des échantillons d'eau au laboratoire. Le molybdate d'ammonium et le tartrate double de potassium et d'antimoine réagissent en milieu acide avec les orthophosphates pour donner un complexe antimoine-phosphate-molybdate. Ce complexe est réduit par l'acide ascorbique en un composé fortement coloré en bleu qui est dosé par en spectrophotométrie (maximum d'absorption à 882 nm et à 710 nm).

Un volume de 15 ml d'échantillon d'eau est placé dans un tube en verre de 50 ml avant d'être mélangé à 4 ml de réactif combiné avec réducteur (Acide sulfurique 1.25 mol/l ; tartrate d'antimoine et de potassium 0.2 mmol/l ; molybdate d'ammonium 5 mmol/l ; acide ascorbique 30 mmol/l). Après une incubation à température ambiante comprise entre 15 minutes et 1 heure, la DO est mesurée à 710 nm (spectrophomètre UV-visible, Shimadzu) dans des cuves de 5 cm de trajet optique par comparaison avec un témoin préparé à partir d'eau déminéralisée.

La concentration en phosphates (en mg/l) est ensuite déterminée grâce à une droite d'étalonnage, construite à partir d'une gamme de concentration en phosphates comprise entre 0 et 1 mg/l. Cette droite est refaite à chaque changement de réactif, c'est-à-dire au début de chaque campagne d'échantillonnage.

3.4.2.4 Température, pH et conductivité

La température, le pH et la conductivité sont mesurés sur les 5 litres d'eau recueillis à l'aide de l'échantillonneur automatique.

Dans le cas du volet I, la température était mesurée à l'aide d'une sonde combinée conductivité – température. Du fait de la durée de l'échantillonnage (24 h), la valeur relevée a pu, à certaines saisons et à certaines stations, être décalée par rapport à la température du milieu au moment où l'échantillonneur était récupéré.

Dans le cas du volet II (réseau aixois), la température était enregistrée par les sondes SP2T 10-SI, simultanément à l'enregistrement de la hauteur d'eau.

La sonde conductivité est une sonde WTW (boîtier Multi340i et sonde TetraCon® 325).

Le pH est mesuré à l'aide d'un pH-mètre (Tacussel Minisis 6000) équipé d'une électrode combinée en verre.

L'étalonnage des différentes sondes était effectué avant chaque utilisation (cas du pH) ou dès que nécessaire (de préférence avant le début de chaque campagne de prélèvement)

3.4.2.5 Suivi des débits

Au cours du volet consacré à l'étude du bassin versant du lac du Bourget (volet I), les débits des principaux affluents ont été obtenus grâce à la banque de donnée HYDRO, et, dans le cas particulier du canal de Savières, grâce à celle de la Compagnie Nationale du Rhône.

Sur le réseau hydrographique de la ville d'Aix-les-Bains, les débits ont été obtenus à l'aide de 10 limnigraphes (NKE Instrumentation, SP2T 10-SI généreusement prêtés par EDF) implantés tout au long du réseau (Figure 25). Il s'agissait en fait de capteurs de pression dont 8 étaient installés sur le fond des cours d'eau, qu'ils soient busés ou non, et 2 installés au-dessus de la surface de l'eau (au niveau des stations Chaudanne et Liège) pour la mesure de la pression atmosphérique. Les valeurs enregistrées par ces deux capteurs devaient permettre de corriger les hauteurs d'eau obtenues à l'aide des capteurs immergés. Dans la pratique, en raison d'incohérences dans l'enregistrement de la pression atmosphérique au niveau de la station Chaudanne, seules les données du capteur atmosphérique situé à la station Liège ont été utilisées.

Les valeurs brutes de hauteur d'eau ont été corrigées sur la base de la formule suivante :

Hauteur d'eau effective = mesure brute – valeur donnée pour l'air +/- constante de correction

La constante de correction est déterminée au cours de chaque jaugeage. Elle correspond en effet à la différence entre la hauteur d'eau mesurée lors du jaugeage et la valeur obtenue par le capteur, elle-même corrigée par la pression atmosphérique. Une dérive de cette constante a été observée et c'est pourquoi il a été nécessaire d'interpoler cette constante entre 2 jaugeages.

Une courbe de tarage spécifique à chaque station a été établie pour la transformation des hauteurs d'eau en débit (Figure 26). Pour cela, des jaugeages au micro-moulinet ont été effectués dans chacune des stations et dans différentes conditions hydrologiques. Certaines courbes n'ont pas pu être établies en raison de pertes de données occasionnées par les pannes des enregistreurs. De plus, lors des épisodes de débits importants, il n'était pas toujours possible de pénétrer dans les stations Parking et Aquarium en raison de la hauteur d'eau ou en raison de la vitesse de l'eau comme à la station Liège. Pour toutes ces raisons, le nombre de points utilisé pour le calcul des équations de tarage a souvent été limité.

Les données enregistrées ont été utilisées à la fois au cours du volet consacré à l'évolution du biofilm à l'aval d'arrivées des eaux thermales (chapitre 6) mais aussi dans le cadre de la construction du modèle pluie-débit décrit dans le chapitre 9.

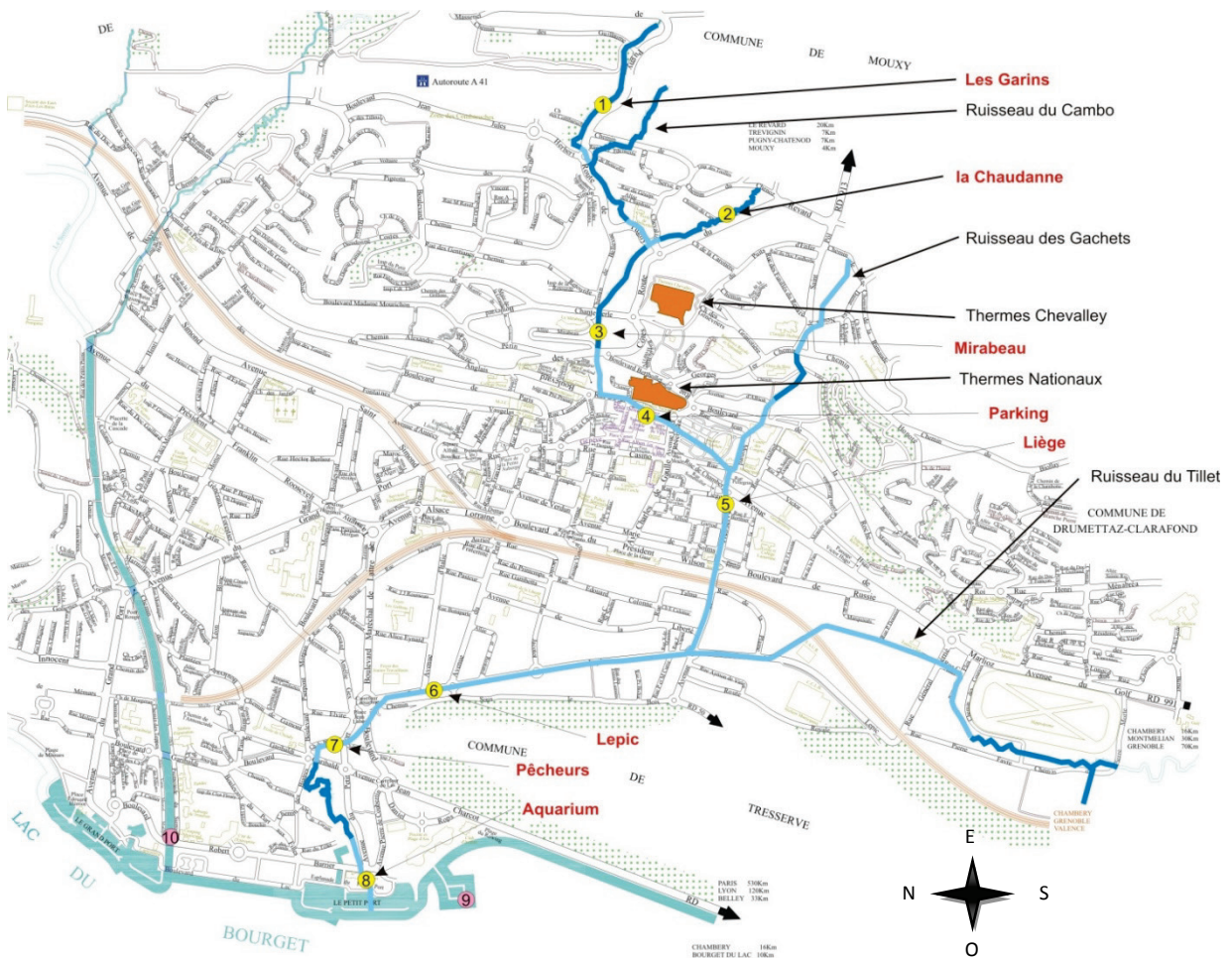


Figure 25: Stations du réseau hydrographique aixois équipées en limnigraphes.

Les enregistrements s'étendent sur une période allant du 24 mai 2007 au 9 avril 2010 avec un pas de temps de 15 minutes (Tableau 10). Les problèmes rencontrés dans la mise en œuvre et l'exploitation des capteurs (déplacement du module à la station Mirabeau, panne aux stations Parking, Liège et Aquarium) ont conduit à une certaine hétérogénéité de la matrice de données finale, notamment du point de vue des périodes d'enregistrement aux différentes stations. Le capteur placé à la station Liège a subi une panne importante en raison d'un important dépôt de calcaire qui en a endommagé la membrane et a causé la perte des données postérieures au 10 juillet 2008. Les données provenant du capteur de la station Garin, situé dans une zone où la hauteur d'eau était trop faible, se sont également avérées inexploitable (mises à sec trop fréquentes).

Tableau 10 : Périodes d'enregistrements des débits "exploitables" à chacune des stations équipées d'un limnigraphe.

Station	Aérien Liège	
	Début d'enregistrement	Fin d'enregistrement
Chaudanne	24/05/2007 14:31	01/07/2009 07:22
Mirabeau	12/07/2007 07:31	01/07/2009 07:22
Parking	21/11/2007 15:27	01/07/2009 07:22
Liège	24/05/2007 09:16	10/07/2008 13:27
Lepic	24/05/2007 09:16	01/07/2009 07:22
Pêcheur	24/05/2007 09:16	01/07/2009 07:22
Aquarium	24/05/2007 09:16	01/07/2009 07:22

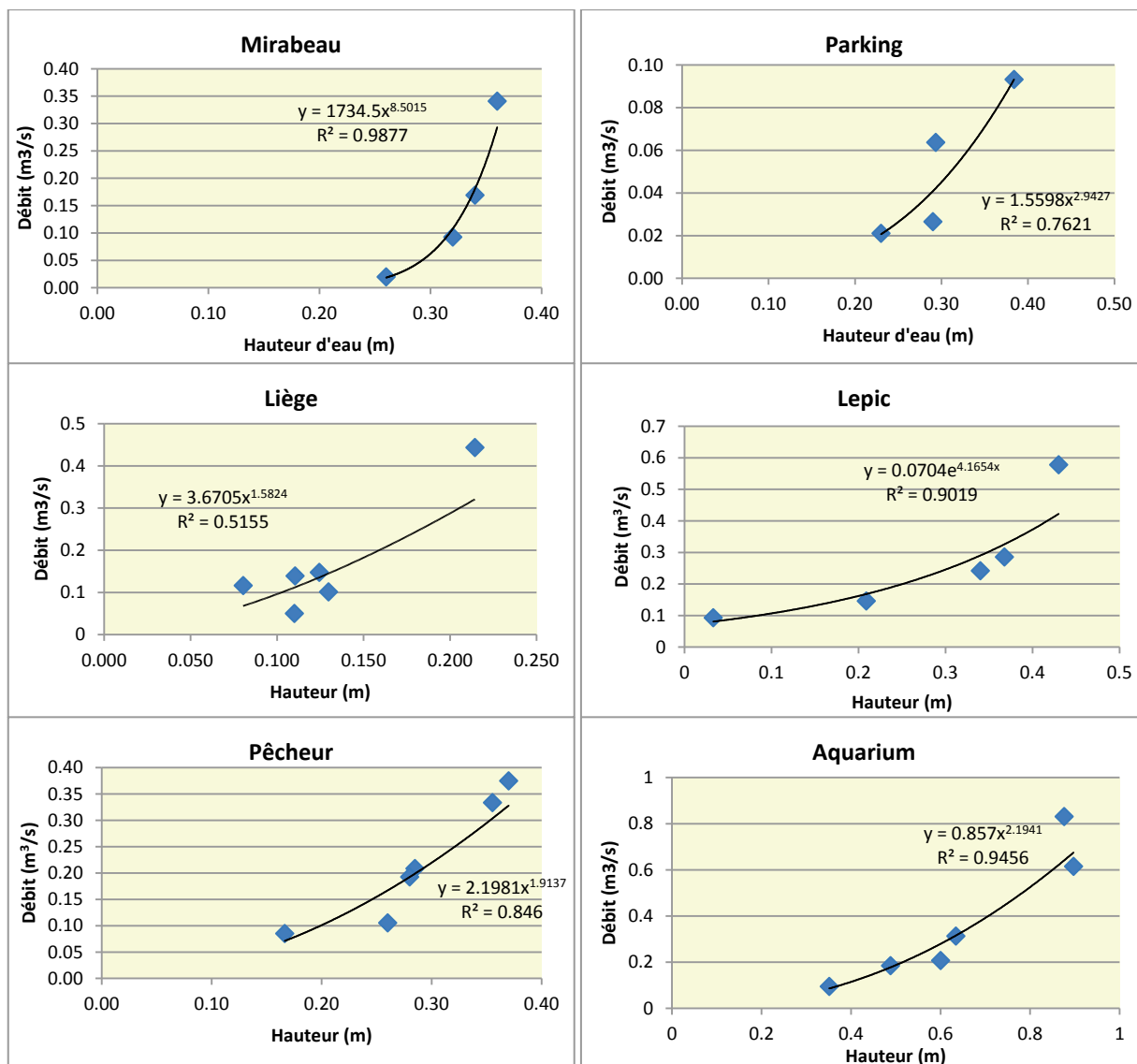


Figure 26 : Courbes de tarages des stations du réseau aixois équipées d'un limnigraphe.

L'analyse des débits des volets environnementaux (Bassin versant et Réseau Aixois) passe par l'estimation des variations journalières de débit (ΔQ_j) calculée de la manière suivante :

$$\Delta Q_j (X) = \frac{(\text{Débit moyen journalier à J1} - \text{Débit moyen journalier à J0})}{\text{Débit moyen journalier à J0}} \times 100$$

Deux seuils de ΔQ_j ont été retenus : celui de 50% et celui de 100%.

Cette variation de débit est considérée comme "significative" lorsqu'elle est supérieure à 50% et qu'elle s'effectue sur un débit à J0 élevé.

3.5 Analyses de données

Après vérification, il nous est apparu que la plupart des données de nos matrices ne répondent pas à une distribution Normale. Nous avons donc choisi d'effectuer nos tests à l'aide d'outils non-paramétriques.

3.5.1 Calcul des médianes et dispersion des données

La plupart de nos échantillons ont été acquis en triplicats. Ce sont donc les médianes et un indicateur de leur dispersion, le MAD (Median Absolute Deviation), qui ont été calculés pour chaque descripteur, chaque date et chaque station et qui sont présentés dans les chapitres qui suivent.

Le MAD est calculé à partir de la formule suivante (Ohno, *et al.*) :

$$\text{MAD} = \text{Médiane } |x - \text{Médiane}(x)|$$

Les calculs de la médiane et du MAD sont effectués à l'aide du logiciel Statview™. Les résultats sont ensuite importés dans Excel™ pour en faire des représentations graphiques.

3.5.2 Tests de comparaison de données

Lorsqu'il s'agissait de comparer des données deux à deux, comme c'est le cas pour les types de substrats des biofilms (substrats naturels / artificiels) ou pour les expérimentations sur les effets de la vitesse et de la température de l'eau, nous avons choisi d'effectuer l'analyse à l'aide du test U de Mann-Whitney. Le principe de ce test est de classer tous les objets dans une même série puis de tester leur appartenance à une même population (H_0). Ce test a été préféré au test des médianes en raison de son meilleur pouvoir discriminant (Legendre & Legendre, 1998).

Le test de Mann-Whitney est effectué grâce au logiciel Statistica (StatSoft Inc., Tulsa, USA). Nous l'avons utilisé uniquement avec un intervalle de confiance de 95%.

3.5.3 Recherche de corrélation

La recherche de corrélation entre les descripteurs deux à deux est également effectuée à l'aide d'un test non paramétrique : le calcul du coefficient de corrélation τ de Kendall à un niveau de confiance de 95%.

Les objets correspondants à chacun des deux descripteurs sont tout d'abord classés par rang croissant. Les rangs de chaque paire d'observations sont alors comparés à ceux de chacune des autres paires pour en noter la concordance (notée +1) ou la discordance (notée -1). Il y a concordance lorsque les deux objets d'un couple sont supérieurs aux objets correspondants du 2^{ème} couple. La mesure du degré d'association entre les deux descripteurs est réalisée par le calcul du coefficient τ à partir de la formule suivante :

$$\tau = \frac{2S}{n(n-1)}$$

où S représente la somme des scores obtenus par chaque paire et n le nombre total de paires.

Si deux descripteurs sont fortement corrélés, la valeur de τ est proche de +/- 1 selon que la corrélation est positive ou négative. A l'inverse, lorsque que les deux descripteurs ne sont pas liés, la valeur de τ est proche de 0 (Legendre & Legendre, 1998).

La signification de la corrélation est ensuite testée par référence à l'hypothèse nulle H_0 , pour laquelle les deux descripteurs sont indépendants. Ce test statistique est obtenu en transformant τ en z grâce à la formule :

$$z = \left[|\tau| \sqrt{\frac{9n(n-1)}{2(2n+5)}} \right] - \sqrt{\frac{18}{n(n-1)(2n+5)}}$$

La valeur de z critique permettant d'accepter ou de rejeter H_0 est déterminée à l'aide d'une table (Legendre & Legendre, 1998).

Ce test a été préféré au test r de Spearman. Même si ces deux tests donnent des résultats proches, le τ de Kendall donne une meilleure approximation du r de Pierson qui est un test paramétrique lorsque l'on est en présence de valeurs ex aequo comme cela est régulièrement le cas entre nos réplicats. En absence de telles valeurs, c'est le r de Spearman qui donne alors la meilleure approximation (Legendre & Legendre, 1998).

Il est également possible de calculer un coefficient de corrélation partielle à partir du calcul du τ de Kendall, mais il n'est pas possible de calculer la significativité de ce coefficient de corrélation partielle (Legendre & Legendre, 1998).

Le logiciel Statistica est également utilisé pour la recherche de corrélation.

3.5.4 Analyse en Composantes Principales

L'Analyse Factorielle en Composantes Principales (ACP) a été l'une de nos premières approches pour essayer de mettre en évidence les structures de nos matrices de données. Dans la pratique, cette approche a nécessité une partition préalable des matrices en "groupes cohérents" basés sur des critères tels, par exemple, que la géographie ou la saison. Les groupes ont été constitués spécifiquement en fonction des données à analyser. Les détails les concernant sont présentés dans les chapitres correspondants.

Ces analyses ont été effectuées sous le logiciel Statistica.

***4- Comparaison des biofilms
en fonction de la technique
d'échantillonnage***

L'étude des biofilms naturels peut s'effectuer en utilisant deux grandes méthodes d'échantillonnage : le prélèvement de biofilms développés sur des supports naturellement présents dans le lit du cours d'eau (galets, piles de pont, roches...) ou celui de biofilms développés sur des supports artificiels (lames de verres non dépolies par exemple) placées dans le cours d'eau pendant une période définie.

Face aux supports naturels, les supports artificiels présentent certains avantages, tels que la facilité des prélèvements sur le terrain, ou la connaissance de la surface échantillonnée et de l'âge du biofilm. Les substrats artificiels sont principalement utilisés lors de l'étude de la phase de colonisation et des stades jeunes des biofilms. La durée d'incubation dans le cours d'eau est donc choisie par l'expérimentateur en fonction de ses besoins. La surface de développement du biofilm est connue avec plus de certitude, lors de l'utilisation de supports lisses (lames de verres non dépolies) tandis que la grande majorité des substrats naturellement présents dans les cours d'eau sont rugueux.

En amont des résultats obtenus sur les substrats artificiels, il a été nécessaire de comparer les biofilms prélevés à l'aide de ces deux techniques, que ce soit au niveau de leur structure générale, ou de la structure de leur communauté de microorganismes. La comparaison des échantillons en fonction du type de substrat est effectuée à l'aide du test de rang U de Mann Whitney avec un risque d'erreur $\alpha=5\%$. D'autres paramètres sont également pris en compte pour effectuer cette comparaison, c'est le cas du coefficient de variation des triplicats autour de la médiane ou encore de la stabilité des résultats d'une année sur l'autre, pour une même période de l'année.

4.1 Comparaison des caractéristiques générales des biofilms

4.1.1 Poids sec du biofilm

L'hétérogénéité du poids sec des biofilms au cours d'une même campagne de prélèvement est comparée en fonction de la nature du substrat (Tableau 11).

A quelques exceptions près, la variabilité inter-réplikat est inférieure sur les substrats artificiels pour les 3 campagnes de prélèvement. Notons que la campagne d'octobre 2008, présente les plus fortes hétérogénéités entre les réplikat prélevés quel que soit le type de substrats échantillonné.

Tableau 11: Evolution de la variabilité (MAD/Médiane) inter-réplikat du poids sec des biofilms en fonction du type de substrat par campagne et par station (CV_{MAD}). Nombre d'observations par campagne où le CV_{MAD} est équivalent entre les deux types de substrats ou inférieur sur les substrats artificiels.

Station	Mai 2008		Octobre 2008		Mai 2009	
	S. Artificiels	S. Naturels	S. Artificiels	S. Naturels	S. Artificiels	S. Naturels
Sierroz	22%	35%	29%	7%	1%	59%
Aquarium	0%	12%	17%	21%	50%	6%
Tillet	5%	46%	18%	33%	2%	15%
Terre Nue	15%	12%	8%	96%	2%	33%
Hyères	33%	77%	12%	48%	4%	23%
Albanne	50%	44%	1%	53%	36%	12%
Leyse	29%	13%	100%	50%	5%	27%
Plage	12%	2%	3%	42%	6%	21%
Savières	15%	77%	9%	65%	50%	15%
Nb SA~SN	2		1		0	
Nb SA<SN	5		6		6	

Le type de substrat, probablement à travers l'âge du biofilm, a un impact significatif sur le poids sec des biofilms échantillonnés (Figure 27 et Tableau 13A). Les valeurs minimales et maximales des poids secs et des autres descripteurs « généraux » du biofilm sont indiqués dans le Tableau 12. Le poids secs des biofilms prélevés sur les lames de verre est inférieur à celui des biofilms prélevés sur les substrats naturels (nombre de cas où S.Nat.>S.Art./nombre d'observations : 26/27). Les différences entre les 2 types de substrats sont significatives pour chacune des stations à l'exception de la station Hyères lors de la campagne de mai 2008.

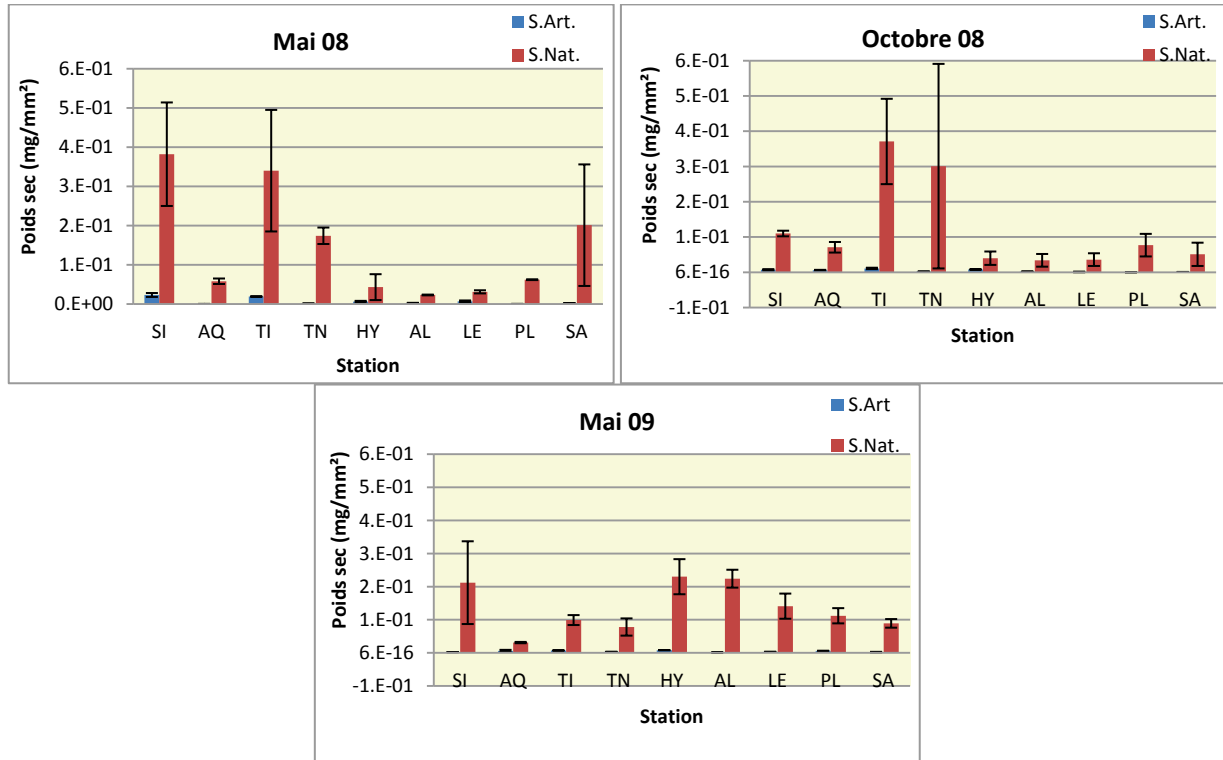


Figure 27: Comparaison du poids sec des biofilms en fonction du type de substrat.

Codes des substrats : S.Art. : substrat artificiel ; S.Nat. : substrat naturel;

Codes des stations : SI : Sierroz, AQ : Aquarium, TI : Tillet, TN : Terre Nue, HY : Hyères, AL : Albanne, LE : Leyse, PL : Plage, SA : Savières.

Tableau 12: Gamme de valeur des descripteurs du biofilm (Poids sec, Matière organique, Proportion de Matière organique) pour chaque campagne en fonction du substrat. La gamme la plus élevée de chaque campagne est indiquée en italique.

		Poids sec (g/mm²)		Matière organique (g/mm²)		% matière organique	
		S. Artificiel	S. Naturels	S. Artificiel	S. Naturels	S. Artificiel	S. Naturels
mai-08	min	1.71E-04	<i>2.30E-02</i>	1.33E-04	<i>5.00E-03</i>	5.11	7.09
	max	2.30E-02	<i>3.82E-01</i>	2.00E-03	<i>4.00E-02</i>	93.9	47.2
oct-08	min	1.43E-04	<i>3.40E-02</i>	5.90E-05	<i>1.30E-03</i>	4.25	5.08
	max	1.10E-02	<i>3.71E-01</i>	2.00E-03	<i>3.30E-02</i>	44.2	22.2
mai-09	min	1.00E-03	<i>3.10E-02</i>	2.10E-04	<i>1.30E-02</i>	10.7	10.4
	max	8.00E-03	<i>2.30E-01</i>	1.00E-03	<i>3.20E-02</i>	26.2	42.3

Tableau 13 : Comparaison du poids sec du biofilm (p-values ; test de Mann Whitney)
A : en fonction du type de substrat pour chaque station et chaque campagne ;
B : entre les 2 campagnes effectuées en mai pour chaque station et par type de substrat).
 La différence est significative pour $p < 0.05$ (valeur en rouge et en gras)

STATION	A- Comparaison SArt./SNat.			B- Comparaison des campagnes mai 08/mai 09	
	mai-08	oct-08	mai-09	SArt.	SNat.
SIERROZ	0.0495	0.0495	0.0495	0.0495	0.1266
AQUARIUM	0.0495	0.0495	0.0495	0.0495	0.0495
TILLET	0.0495	0.0495	0.0495	0.0495	0.0495
TERRE NUE	0.0495	0.0495	0.0495	0.0495	0.5127
HYERES	0.1266	0.0495	0.0495	0.5127	0.0495
ALBANNE	0.0495	0.0495	0.0495	0.1266	0.0495
LEYSSE	0.0495	0.0495	0.0495	0.0495	0.0495
PLAGE	0.0495	0.0495	0.0495	0.0495	0.0495
SAVIERES	0.0495	0.0495	0.0495	0.5127	0.5127

Deux campagnes ont été effectuées à la même période de l'année à un an d'intervalle (mai 2008 et mai 2009), ce qui nous permet de rechercher des changements dans la structure des biofilms d'une année sur l'autre, à une même période, et de voir si les variations observées sont les mêmes pour les deux types de substrats (Tableau 13B). L'importance de la différence d'échelle entre les deux substrats dans les graphiques précédents nous a conduits utiliser à une nouvelle représentation des données pour cette partie de la comparaison (Figure 28).

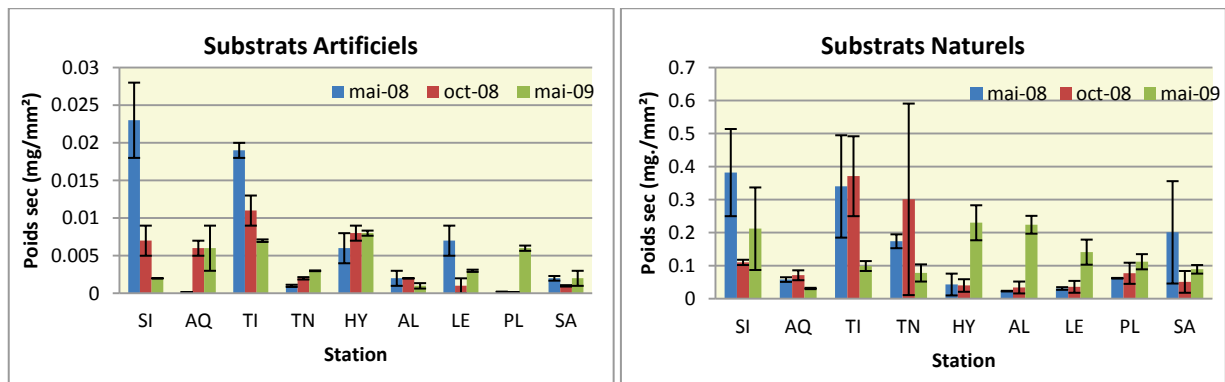


Figure 28: Comparaison du poids sec des biofilms par station en fonction du type de substrat
 Codes des stations : SI : Sierroz, AQ : Aquarium, TI : Tillet, TN : Terre Nue, HY : Hyères, AL : Albanne, LE : Leyse, PL : Plage, SA : Savières

Le poids sec des biofilms provenant des substrats artificiels est significativement différent au cours des deux campagnes des mois de mai sauf pour les stations Savières, Hyères et Albanne.

Les biofilms âgés prélevés sur les substrats naturels sont également significativement différents d'une année sur l'autre pour ce descripteur à l'exception des biofilms prélevés aux stations Savières, Sierroz et Terre Nue.

Seule la station Savières ne présente pas de différence significative d'une année sur l'autre pour les deux types de substrat. D'une manière générale, la nature du substrat n'influence pas la variabilité inter-annuelle de ce descripteur.

4.1.2 Concentration en matière organique

Comme précédemment avec le poids sec des biofilms, l'utilisation des substrats artificiels diminue la variabilité inter-réplicats de concentration de matière organique dans le biofilm (Tableau 14). Cette observation n'est pas valable dans le cas de la campagne d'octobre 2008. Pour cette campagne, en effet, la réponse au changement de substrat dépend de la station. Pour deux d'entre elles, le substrat n'a pas d'incidence sur la variabilité inter-réplicat ; pour 3 autres, les substrats artificiels diminuent cette variabilité, tandis que pour les 4 stations restantes la variabilité est supérieure sur les substrats artificiels.

Tableau 14: Evolution de la variabilité (MAD/Médiane) inter-réplicats de la matière organique des biofilms en fonction du type de substrat par campagne et par station (CV_{MAD}). Nombre d'observations par campagne où le CV_{MAD} est équivalent entre les deux types de substrats ou inférieur sur les substrats artificiels.

Station	Mai 2008		Octobre 2008		Mai 2009	
	S. Artificiels	S. Naturels	S. Artificiels	S. Naturels	S. Artificiels	S. Naturels
Sierroz	14%	4%	32%	25%	4%	23%
Aquarium	14%	1%	8%	12%	3%	8%
Tillet	12%	52%	50%	20%	22%	12%
Terre Nue	6%	25%	11%	70%	3%	46%
Hyères	15%	50%	3%	33%	5%	13%
Albanne	10%	22%	1%	29%	12%	13%
Leyse	9%	13%	26%	8%	10%	32%
Plage	3%	4%	19%	18%	3%	11%
Savières	10%	59%	29%	13%	0%	7%
Nb SA~SN	2		2		1	
Nb SA<SN	5		3		7	

A l'exception de la station Leyse lors de la campagne du mois d'octobre 2008, la concentration en matière organique des biofilms est toujours beaucoup plus élevée dans le cas des substrats naturels que dans celui des substrats artificiels. La différence de concentration en matière organique en fonction du type de substrat est toujours significative (nombre de cas où $S.Nat.>S.Art./$ nombre d'observations : 27/27 ; Figure 29 ; Tableau 12 et Tableau 15).

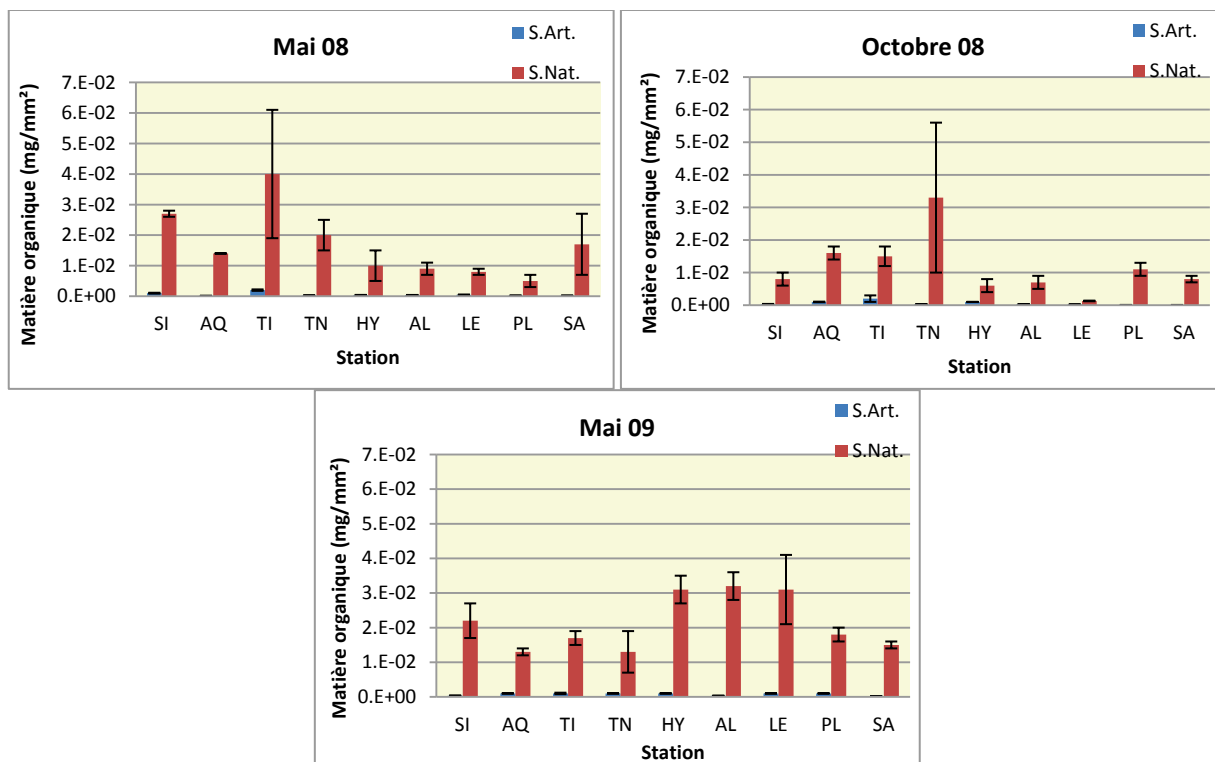


Figure 29: comparaison de la concentration en matière organique en fonction du type de substrat
Codes des substrats : S.Art. : substrat artificiel ; S.Nat. : substrat naturel;
Codes des stations : SI : Sierroz, AQ : Aquarium, TI : Tillet, TN : Terre Nue, HY : Hyères, AL : Albanne,
LE : Leyse, PL : Plage, SA : Savières.

Tableau 15 : Comparaison de la valeur de la matière organique du biofilm (p-values ; test de Mann Whitney)
A : en fonction du type de substrat pour chaque station et chaque campagne ;
B : entre les 2 campagnes effectuées en mai pour chaque station et par type de substrat).
La différence est significative pour $p < 0.05$ (valeur en rouge et en gras)

STATION	A- Comparaison S.Art./S.Nat.			B- Comparaison des campagnes mai 08/mai 09	
	mai-08	oct-08	mai-09	S.Art.	S.Nat.
SIERROZ	0.0495	0.0495	0.0495	0.0495	0.5127
AQUARIUM	0.0495	0.0495	0.0495	0.0495	0.0495
TILLET	0.0495	0.0495	0.0495	0.0495	0.1266
TERRE NUE	0.0495	0.0495	0.0495	0.0495	0.5127
HYERES	0.0495	0.0495	0.0495	0.0495	0.1266
ALBANNE	0.0495	0.0495	0.0495	0.1266	0.0495
LEYSSE	0.0495	0.0495	0.0495	0.5127	0.0495
PLAGE	0.0495	0.0495	0.0495	0.0495	0.0495
SAVIERES	0.0495	0.0495	0.0495	0.8273	0.8273

Pour les deux campagnes effectuées à une même période de l'année sur les substrats artificiels (Figure 30 et Tableau 15B), ce descripteur ne varie pas d'une manière significative pour les stations Savières, Leyse et Albanne, tandis qu'il diminue en 2009 pour les stations Sierroz et Tillet et qu'il augmente pour les autres stations.

Sur les substrats naturels, seuls les biofilms des stations Aquarium, Plage, Leyse et Albanne présentent des différences significatives entre ces 2 campagnes, ces variations vont dans le sens d'une légère diminution pour la station Aquarium et d'une augmentation pour les stations Plage, Lepic et Albanne.

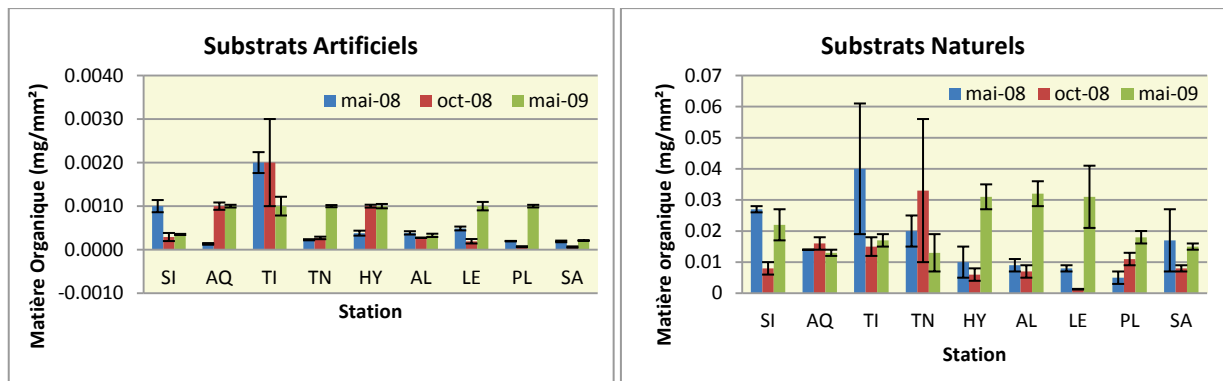


Figure 30: Comparaison des concentrations en matière organique des biofilms selon le type de substrat. Codes des stations : SI : Sierroz, AQ : Aquarium, TI : Tillet, TN : Terre Nue, HY : Hyères, AL : Albanne, LE : Leyse, PL : Plage, SA : Savières.

4.1.3 Proportion de matière organique

Il semble que l'utilisation des substrats naturels augmente l'hétérogénéité inter-répliat lorsque l'on considère le rapport entre la matière organique du biofilm et son poids sec (Tableau 16). Cette observation est principalement valable lors des deux premières campagnes, pour lesquelles le CV_{MAD} reste généralement inférieur à 10% sur les substrats artificiels tandis qu'il est généralement supérieur à cette même valeur de 10% sur les substrats naturels. Cette tendance est moins marquée au cours de la dernière campagne.

Tableau 16 : Evolution de la variabilité (MAD/Médiane) inter-réplicats de la proportion de matière organique (Matière organique/Poids sec) des biofilms en fonction du type de substrat par campagne et par station (CV_{MAD}). Nombre d'observations par campagne où le CV_{MAD} est équivalent entre les deux types de substrats ou inférieur sur les substrats artificiels.

Station	Mai 2008		Octobre 2008		Mai 2009	
	S. Artificiels	S. Naturels	S. Artificiels	S. Naturels	S. Artificiels	S. Naturels
Sierroz	0%	16%	0.5%	9%	1%	22%
Aquarium	10%	6%	2%	8%	26%	14%
Tillet	3%	3%	8%	1%	9%	1%
Terre Nue	2%	11%	0%	10%	3%	21%
Hyères	7%	19%	5%	14%	9%	11%
Albanne	16%	13%	3%	46%	13%	0%
Leyse	14%	25%	19%	14%	3%	5%
Plage	6%	18%	7%	17%	3%	9%
Savières	6%	15%	11%	24%	40%	6%
Nb SA~SN	2		1		2	
Nb SA<SN	6		7		3	

A l'inverse des résultats obtenus précédemment sur chacun des 2 descripteurs considérés séparément, la proportion de matière organique dans les biofilms ne met pas en évidence d'influence marquée du type de substrat : la différence n'est pas significative dans 9 observations sur 27. Dans les autres cas, le type de substrat n'a pas le même effet sur la concentration de matière organique en fonction de la campagne et de la station (nombre de cas où S.Nat.>S.Art./nombre d'observations : 8/27 ; Tableau 17A, Tableau 12 et Figure 31).

En mai 2008, ce rapport n'est pas significativement différent en fonction du type de substrat pour les stations Tillet et Savières, c'est également le cas pour les stations Sierroz, Hyères et Albanne lors de la campagne d'octobre 2008, ainsi que pour les stations Tillet, Terre Nue, Hyères et Savières en mai 2009.

Le rapport Matière organique/Poids sec est plus important dans les biofilms des substrats naturels pour les stations Sierroz, Hyères, Albanne et Leyse en mai 2008 ; Aquarium et Savières en octobre 2008 ; ainsi qu'Aquarium et Leyse en mai 2009. A l'inverse, ce rapport est plus élevé dans les biofilms développés sur les substrats artificiels dans les stations Aquarium, Terre Nue et Plage en mai 2008 ; Tillet, Leyse et Plage en octobre 2008 ; et Sierroz, Albanne et Plage en mai 2009.

Seule la station Plage présente le même comportement au cours des 3 campagnes, c'est-à-dire une proportion de matière organique supérieure dans les biofilms développés sur substrats artificiels. Les biofilms de la station Leyse semblent avoir un comportement différent en fonction de la saison. En effet, lors des deux campagnes effectuées en mai, la fraction organique est plus importante au sein des biofilms des substrats naturels tandis que l'inverse est observé durant la campagne du mois d'octobre 2008.

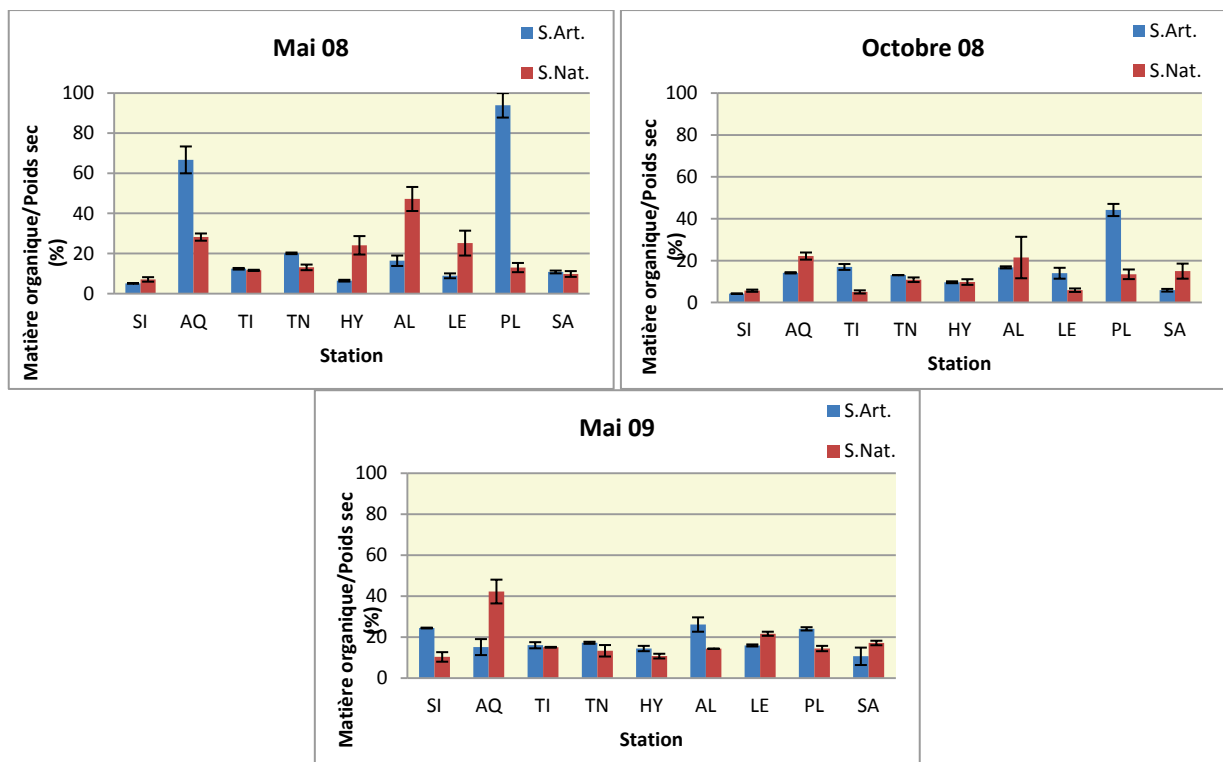


Figure 31: Comparaison de la proportion de la matière organique (Matière organique / Poids sec) du biofilm.

Codes des substrats : S.Art. : substrat artificiel ; S.Nat. : substrat naturel;

Codes des stations : SI : Sierroz, AQ : Aquarium, TI : Tillet, TN : Terre Nue, HY : Hyères, AL : Albanne, LE : Leyse, PL : Plage, SA : Savières.

Tableau 17 : Comparaison de la proportion de la matière organique (Matière organique/Poids sec) du biofilm (p-values ; test de Mann Whitney)

A : en fonction du type de substrat pour chaque station et chaque campagne ;

B : entre les 2 campagnes effectuées en mai pour chaque station et par type de substrat).

La différence est significative pour $p < 0.05$ (valeur en rouge et en gras).

STATION	A- Comparaison S.Art./S.Nat.			B- Comparaison des campagnes mai 08/mai 09	
	mai-08	oct-08	mai-09	S.Art.	S.Nat.
SIERROZ	0.0495	0.1266	0.0495	0.0495	0.1266
AQUARIUM	0.0495	0.0495	0.0495	0.0495	0.0495
TILLET	0.2752	0.0495	0.8273	0.0495	0.0495
TERRE NUE	0.0495	0.0495	0.1266	0.0495	0.8273
HYERES	0.0495	0.8273	0.1266	0.0495	0.0495
ALBANNE	0.0495	0.5127	0.0495	0.1266	0.0495
LEYSSE	0.0495	0.0495	0.0495	0.0495	0.5127
PLAGE	0.0495	0.0495	0.0495	0.0495	0.5127
SAVIERES	0.2752	0.0495	0.5127	0.8273	0.1267

Au cours des 2 campagnes effectuées en mai (Figure 32, Tableau 17B), les résultats obtenus sur substrats artificiels sont significativement différents sauf pour les stations Savières et Albanne. Les valeurs les plus fortes sont observées en 2008 pour les stations Aquarium, Plage et Terre Nue, tandis qu'elles le sont en 2009 pour les stations restantes c'est-à-dire Sierroz, Tillet, Leysse et Hyères.

La proportion de matière organique est plus stable lorsque l'on s'intéresse aux biofilms des substrats naturels. En effet, le rapport n'est pas différent entre les deux années pour les 5 stations suivantes : Savières, Sierroz, Plage, Terre Nue et Leysse. Pour les stations Plage et Tillet la fraction organique du biofilm est plus importante en 2009, tandis que c'est en 2008 qu'elle est la plus forte pour les stations Hyères et Albanne.

L'utilisation des substrats artificiels semble donc augmenter la variabilité inter-annuelle de la proportion de matière organique.

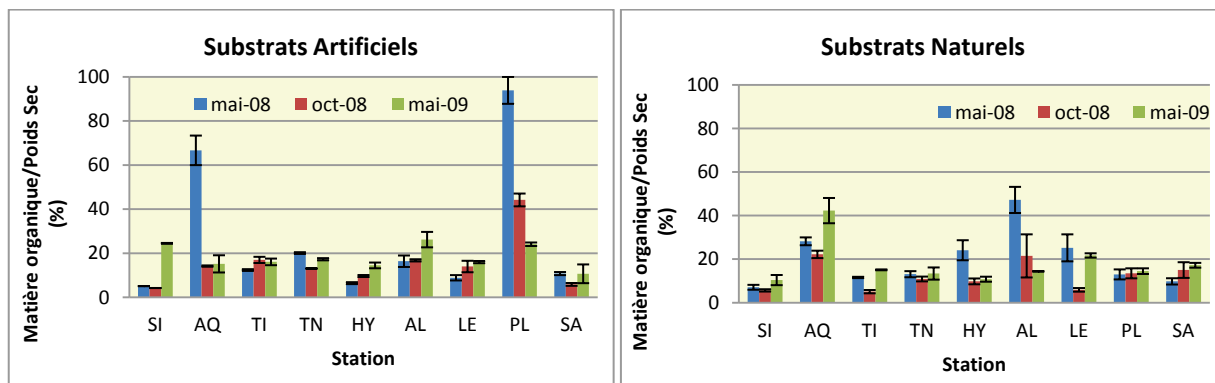


Figure 32: Comparaison des rapports Matière organique/Poids Sec par campagne en fonction du type de substrat.

Codes des stations : SI : Sierroz, AQ : Aquarium, TI : Tillet, TN : Terre Nue, HY : Hyères, AL : Albanne, LE : Laysse, PL : Plage, SA : Savières.

Le type de substrat a donc un impact non négligeable sur le développement général du biofilm. Lorsque l'on considère indépendamment le poids sec du biofilm et sa concentration en matière organique, les valeurs sont supérieures dans le cas des biofilms provenant de substrats naturels. Par contre, lorsque l'on s'intéresse au rapport Matière organique/Poids sec, la nature du substrat a une influence beaucoup moins marquée avec des différences en fonction des stations et des campagnes.

On note également l'existence d'une variabilité à la fois inter-répliat et inter-annuelle de ces descripteurs. L'utilisation des substrats artificiels permet régulièrement de diminuer la variabilité inter-répliat mais augmenterait la variabilité interannuelle. Certaines campagnes ou certaines stations font toutefois exception.

4.2 Communauté bactérienne

4.2.1 Concentration des bactéries_{totales}

Comme cela était le cas concernant les descripteurs généraux des biofilms, l'utilisation des substrats artificiels permet d'obtenir des échantillons ayant une concentration des bactéries_{totales} plus homogènes au sein de la majorité des stations (Tableau 18). Ceci est principalement visible au cours des deux campagnes des mois de mai. En effet, le CV_{MAD} est inférieur à 10% sur les substrats artificiels alors qu'il est supérieur à 20% sur les substrats naturels. Ceci est moins marqué en octobre 2008, même si les valeurs maximales sont observées sur les substrats naturels avec des rapports pouvant atteindre 78%.

Tableau 18 : Evolution de la variabilité (MAD/Médiane) inter-réplicats de la concentration en bactéries totales (DAPI) des biofilms en fonction du type de substrat par campagne et par station (CV_{MAD}). Nombre d'observations par campagne où le CV_{MAD} est équivalent entre les deux types de substrats ou inférieur sur les substrats artificiels.

Station	Mai 2008		Octobre 2008		Mai 2009	
	S. Artificiels	S. Naturels	S. Artificiels	S. Naturels	S. Artificiels	S. Naturels
Sierroz	10%	23%	2%	7%	5%	5%
Aquarium	3%	2%	7%	5%	3%	28%
Tillet	1%	35%	1%	78%	6%	4%
Terre Nue	8%	24%	6%	1%	3%	48%
Hyères	1%	14%	3%	18%	3%	1%
Albanne	0%	7%	1%	21%	15%	2%
Leyse	16%	6%	8%	21%	3%	28%
Plage	3%	21%	9%	3%	23%	1%
Savières	23%	34%	13%	36%	1%	12%
Nb SA~SN	1		1		3	
Nb SA<SN	7		6		4	

Les concentrations des bactéries_{totales} sont significativement supérieures dans les biofilms développés sur les substrats naturels (d'un facteur 10 à 200) (Figure 33 ;Tableau 19 et Tableau 20A) et aucune station ne fait exception (nombre de cas où S.Nat.>S.Art./nombre d'observations : 27/27).

Les gammes de concentrations et de proportions des différentes formes de la communauté bactérienne sont résumées dans le Tableau 19.

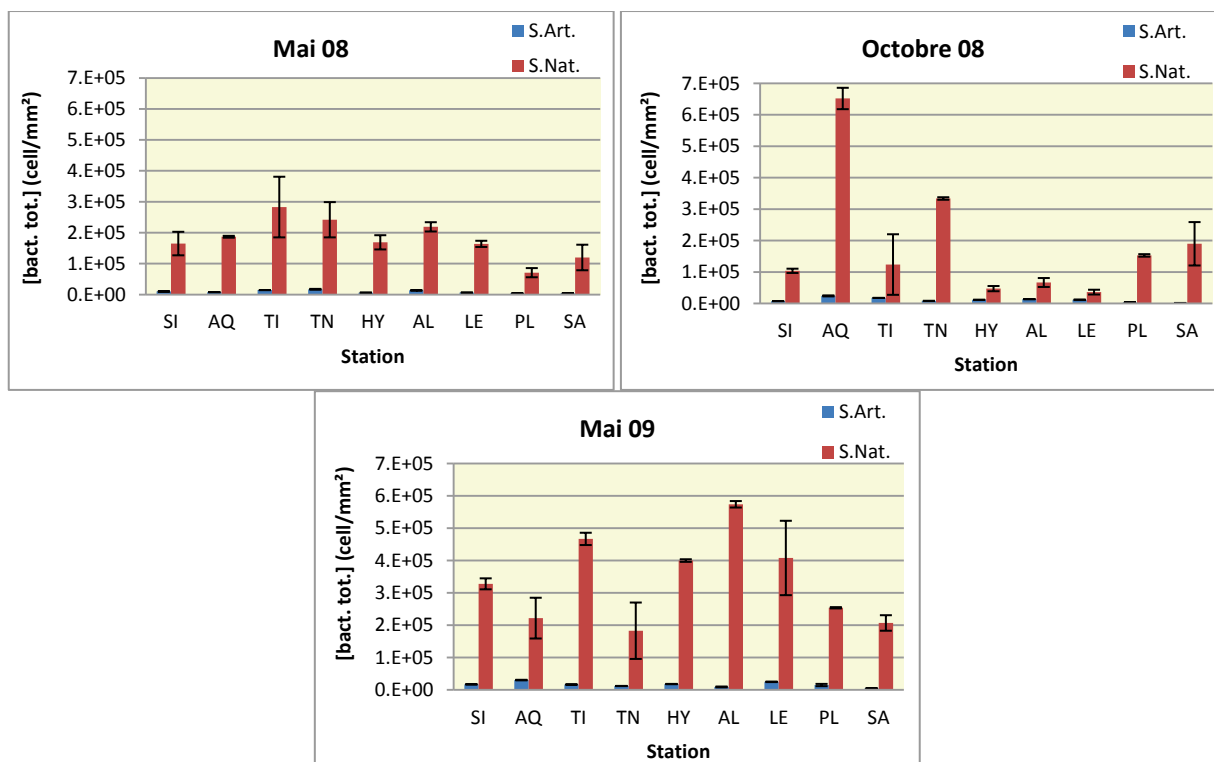


Figure 33: Comparaison de la concentration en bactéries_{totales} (DAPI).

Codes des substrats : S.Art. : substrat artificiel ; S.Nat. : substrat naturel;

Codes des stations : SI : Sierroz, AQ : Aquarium, TI : Tillet, TN : Terre Nue, HY : Hyères, AL : Albanne, LE : Leyse, PL : Plage, SA : Savières

Tableau 19 : Gammes des concentrations des bactéries totales et cultivables ; gamme des proportions des bactéries_{cultivables}. La gamme la plus élevée de chaque campagne est indiquée en italique.

		Bactéries _{totales} (bact/mm ²)		Bactéries _{cultivables} (UFC/mm ²)		% bactéries _{cultivables}	
		S. Artificiel	S. Naturels	S. Artificiel	S. Naturels	S. Artificiel	S. Naturels
mai-08	min	3.74E+03	<i>7.09E+04</i>	3.00E+01	3.80E+02	0.92	0.23
	max	1.71E+04	<i>2.83E+05</i>	1.90E+03	1.68E+04	13.70	5.19
oct-08	min	1.68E+03	<i>3.63E+04</i>	1.30E+01	5.05E+02	0.37	0.27
	max	2.43E+04	<i>6.52E+05</i>	2.31E+03	1.30E+04	12.90	17.50
mai-09	min	4.71E+03	<i>1.83E+05</i>	6.64E+01	9.05E+02	0.93	0.36
	max	3.04E+04	<i>5.74E+05</i>	4.74E+03	4.53E+04	11.00	8.46

Tableau 20: Comparaison de la concentration des bactéries_{totales} (p-values ; test de Mann Whitney)

A : en fonction du type de substrat pour chaque station et chaque campagne ;

B : entre les 2 campagnes effectuées en mai pour chaque station et par type de substrat).

La différence est significative pour p<0.05 (valeur en rouge et en gras).

STATION	A- Comparaison S.Art./S.Nat.			B- Comparaison des campagnes mai 08/mai 09	
	mai-08	oct-08	mai-09	S.Art.	S.Nat.
SIERROZ	0.0495	0.0495	0.0495	0.0495	0.0495
AQUARIUM	0.0495	0.0495	0.0495	0.0495	0.2752
TILLET	0.0495	0.0495	0.0495	0.1266	0.5127
TERRE NUE	0.0495	0.0495	0.0495	0.0495	0.5127
HYERES	0.0495	0.0495	0.0495	0.0495	0.0495
ALBANNE	0.0495	0.0495	0.0495	0.0495	0.0495
LEYSSE	0.0495	0.0495	0.0495	0.0495	0.0495
PLAGE	0.0495	0.0495	0.0495	0.0495	0.0495
SAVIERES	0.0495	0.0495	0.0495	0.5127	0.5127

Lorsque l'on sépare les graphiques en fonction du type de substrat (Figure 34, Tableau 20B), on peut remarquer qu'au cours des mois de mai, les biofilms développés sur les substrats artificiels présentent des concentrations de bactéries_{totales} qui sont significativement différentes d'une année sur l'autre, à l'exception des stations Tillet et Savières. Sauf pour les stations Terre Nue et Albanne, la concentration est maximale en mai 2009.

Pour les biofilms échantillonnés sur les substrats naturels, les concentrations des bactéries_{totales} ne sont pas significativement différentes pour les stations Aquarium, Tillet, Terre Nue et Savières. Par contre, pour les autres stations les concentrations bactériennes sont plus élevées en mai 2009.

L'utilisation des substrats artificiels engendre donc une variabilité inter-annuelle plus importante (Différence significative dans 7 stations sur les substrats artificiels et dans 5 stations avec les substrats naturels).

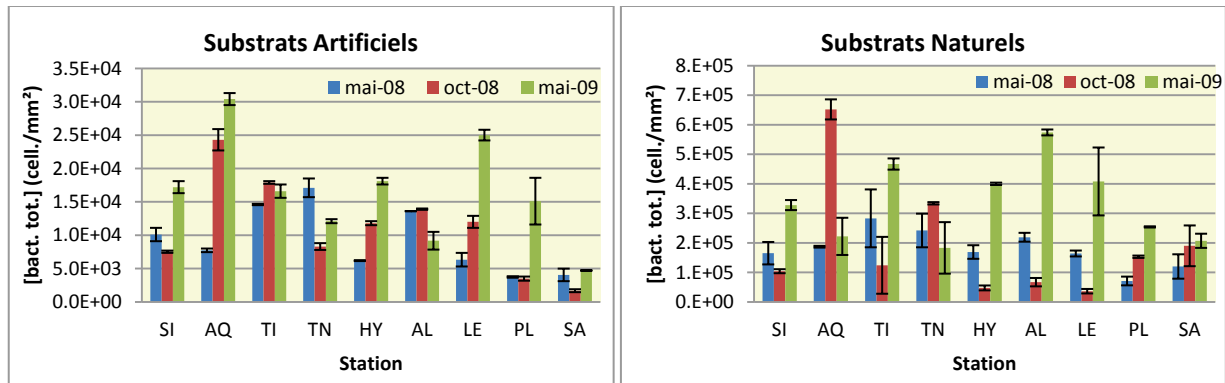


Figure 34: Comparaison des concentrations en bactéries_{totales} par stations en fonction du type de substrat
Codes des stations : SI : Sierroz, AQ : Aquarium, TI : Tillet, TN : Terre Nue, HY : Hyères, AL : Albanne,
LE : Leyse, PL : Plage, SA : Savières.

4.2.2 Concentrations des bactéries_{cultivables}

On remarque que les CV_{MAD} des concentrations des bactéries_{cultivables} sont plus importants que ceux calculés à partir des concentrations des bactéries_{totales} (Tableau 21). L'influence du type de substrat dépend fortement des stations et des campagnes : les CV_{MAD} sont équivalents dans 10 observations/27 ; supérieurs pour les substrats naturels dans 11 observations/27 et donc supérieurs pour les substrats artificiels dans 6 observations/27.

Tableau 21 : Evolution de la variabilité (MAD/Médiane) inter-réplicats de la concentration en bactéries_{cultivables} des biofilms en fonction du type de substrat par campagne et par station (CV_{MAD}). Nombre d'observations par campagne où le CV_{MAD} est équivalent entre les deux types de substrats ou inférieur sur les substrats artificiels.

Station	Mai 2008		Octobre 2008		Mai 2009	
	S. Artificiels	S. Naturels	S. Artificiels	S. Naturels	S. Artificiels	S. Naturels
Sierroz	14%	17%	11%	15%	40%	18%
Aquarium	7%	6%	11%	8%	0%	4%
Tillet	20%	40%	64%	53%	14%	41%
Terre Nue	6%	73%	3%	93%	17%	61%
Hyères	11%	18%	35%	15%	0%	39%
Albanne	38%	36%	21%	68%	16%	13%
Leyse	10%	22%	17%	82%	50%	18%
Plage	42%	0%	32%	35%	22%	32%
Savières	5%	57%	39%	37%	68%	0.5%
Nb SA~SN	4		4		2	
Nb SA<SN	4		3		4	

Comme pour la communauté bactérienne dans son ensemble, les concentrations des bactéries_{cultivables} dénombrées en mai (2008 et 2009) sont plus élevées dans les biofilms provenant des substrats naturels, sauf pour les stations Albanne en 2008 et Aquarium en 2009 où la différence n'est pas significative (Figure 35, Tableau 19 et Tableau 22A).

Par contre, lors de la campagne effectuée en octobre 2008, un nombre supérieur de stations ne présentent pas de différence significative entre les 2 types de substrats : c'est le cas des stations Aquarium, Tillet, Terre Nue, Albanne et Leyse. Lorsque les concentrations en bactéries_{cultivables} sont significativement différentes, ce sont les biofilms des substrats naturels qui sont les plus chargées en bactéries_{cultivables}.

Sur l'ensemble des données, la concentration des bactéries_{cultivables} est supérieure dans le cas des biofilms des substrats naturels (nombre de cas où S.Nat.>S.Art./nombre d'observations : 19/27).

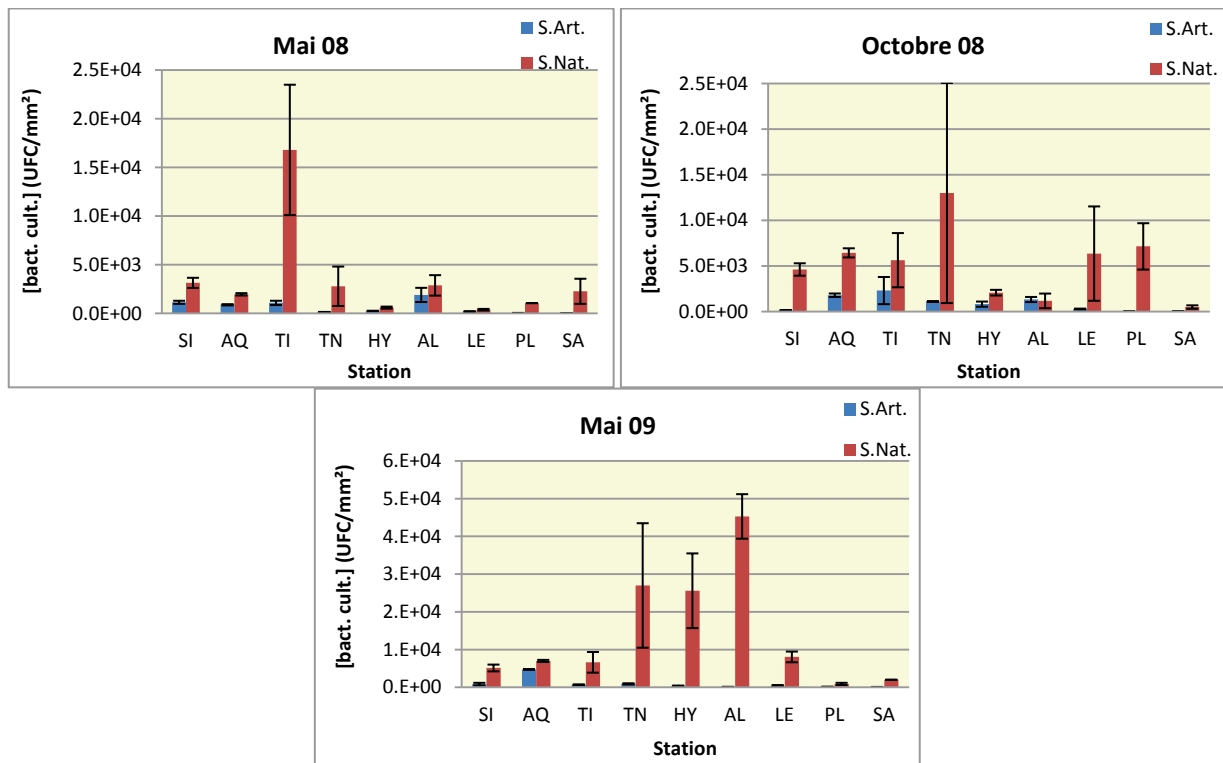


Figure 35: Comparaison des concentrations de bactéries_{cultivables}.

Codes des substrats : S.Art. : substrat artificiel ; S.Nat. : substrat naturel;

Codes des stations : SI : Sierroz, AQ : Aquarium, TI : Tillet, TN : Terre Nue, HY : Hyères, AL : Albanne, LE : Laysse, PL : Plage, SA : Savières.

Tableau 22: Comparaison de la concentration des bactéries_{cultivables} (p-values ; test de Mann Whitney)

A : en fonction du type de substrat pour chaque station et chaque campagne ;

B : entre les 2 campagnes effectuées en mai pour chaque station et par type de substrat).

La différence est significative pour $p < 0.05$ (valeur en rouge et en gras)

STATION	A- Comparaison S.Art./S.Nat.			B- Comparaison des campagnes mai 08/mai 09	
	mai-08	oct-08	mai-09	S.Art.	S.Nat.
SIERROZ	0.0495	0.0495	0.0495	0.5127	0.5127
AQUARIUM	0.0495	0.2752	0.2752	0.0495	0.0495
TILLET	0.0495	0.8273	0.0495	0.1266	0.1266
TERRE NUE	0.0495	0.2752	0.0495	0.0495	0.0495
HYERES	0.0495	nc	0.0495	0.0495	0.0495
ALBANNE	0.2752	0.8273	0.0495	0.2752	0.0495
LEYSSE	0.0495	0.1266	0.0495	0.1266	0.0495
PLAGE	0.0495	0.0495	0.0495	0.0495	0.8273
SAVIERES	0.0495	0.0495	0.0495	0.5127	0.8273

Lorsque l'on s'intéresse uniquement aux substrats artificiels (Figure 36 et Tableau 22B) au cours des campagnes effectuées en mai, les 4 stations Aquarium, Terre Nue, Hyères et Plage voient leurs concentrations de bactéries_{cultivables} varier entre les 2 années. La concentration la plus élevée étant observée en 2009 sauf pour les biofilms prélevés à la station Aquarium.

Sur les substrats naturels (Figure 36 et Tableau 22B), 5 stations présentent une différence significative d'une année sur l'autre : Aquarium, Terre Nue, Hyères, Albanne et Leyse. Les concentrations des bactéries_{cultivables} sont alors plus importantes en mai 2009 qu'en mai 2008. Cette observation rejoint celle effectuée précédemment sur les substrats artificiels.

Le type de substrat influence donc peu la variabilité inter-annuelle de la concentration des bactéries_{cultivables}.

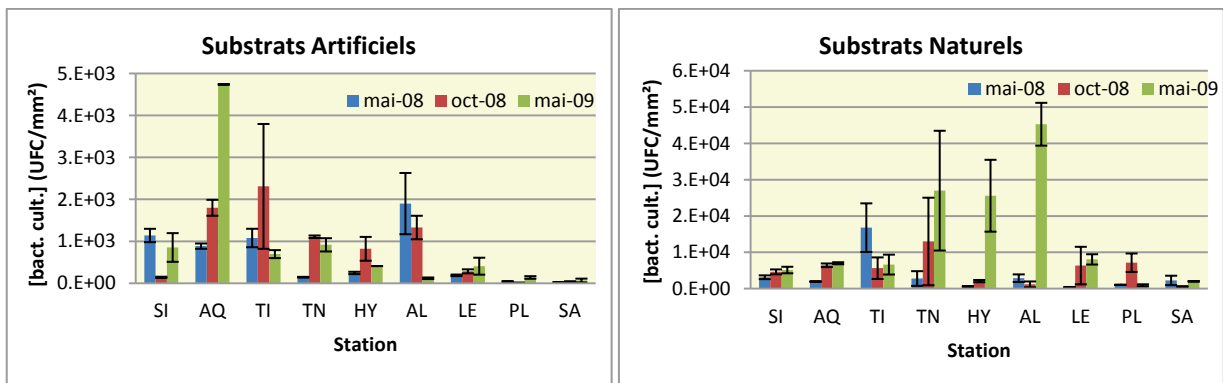


Figure 36: Comparaison des concentrations en bactéries_{cultivables} en fonction du type de substrat.
Codes des stations : SI : Sierroz, AQ : Aquarium, TI : Tillet, TN : Terre Nue, HY : Hyères, AL : Albanne, LE : Leyse, PL : Plage, SA : Savières.

4.2.3 Proportion des bactéries_{cultivables}

La variabilité inter-réplicat de la proportion des bactéries_{cultivables} (Bactéries_{cultivables} / Bactéries_{totales}) est également moins forte sur les substrats artificiels au cours de la première campagne (Tableau 23). A l'inverse, c'est sur les substrats artificiels qu'elle est généralement la plus importante au cours de la dernière campagne. En octobre 2008, son influence dépend de la station. Il n'est donc pas possible de mettre en évidence une influence du type de substrat sur ce rapport Bactéries_{cultivables} / Bactéries_{totales}.

Tableau 23 : Evolution de la variabilité (MAD/Médiane) inter-réplicats de la proportion en bactéries_{cultivables} (Bactéries_{cultivables}/Bactéries_{totales}) des biofilms en fonction du type de substrat par campagne et par station (CV_{MAD}). Nombre d'observations par campagne où le CV_{MAD} est équivalent entre les deux types de substrats ou inférieur sur les substrats artificiels.

Station	Mai 2008		Octobre 2008		Mai 2009	
	S. Artificiels	S. Naturels	S. Artificiels	S. Naturels	S. Artificiels	S. Naturels
Sierroz	0%	4%	7%	4%	33%	8%
Aquarium	6%	32%	4%	3%	42%	32%
Tillet	21%	14%	68%	29%	8%	56%
Terre Nue	21%	38%	10%	4%	15%	39%
Hyères	15%	29%	3%	37%	26%	0%
Albanne	54%	11%	16%	75%	43%	38%
Leyse	22%	31%	0.5%	63%	45%	12%
Plage	37%	57%	37%	31%	29%	5%
Savières	3%	28%	14%	0.5%	56%	28%
Nb SA~SN	1		3		-	
Nb SA<SN	6		3		2	

Les concentrations des bactéries_{totales} et des bactéries_{cultivables} sont supérieures sur les substrats naturels, mais il est important de s'intéresser également à l'influence du substrat sur la proportion des formes cultivables au sein de la communauté bactérienne totale (Figure 37, Tableau 19 et Tableau 24A).

En mai 2008, seules les stations Aquarium, Albanne et Leyse mettent en évidence une différence significative entre les 2 types de substrats. Dans les biofilms de ces trois stations, les bactéries cultivables représentent une plus faible part de la communauté bactérienne sur les substrats naturels que sur les substrats artificiels.

En octobre 2008, on observe 5 stations pour lesquelles ce rapport diffère de manière significative entre les deux types de substrats. Les stations Aquarium, Albanne et Savières ont une proportion de bactéries cultivables plus importante sur les substrats artificiels ; tandis que ce sont les biofilms prélevés sur les substrats naturels qui présentent une plus forte proportion de bactéries_{cultivables} au niveau des stations Sierroz et Plage.

En mai 2009, seules les stations Tillet, Hyères et Plage montrent une différence significative : la proportion de bactéries_{cultivables} est alors supérieure sur les substrats naturels pour la station Hyères.

On remarque ici, que dans certains cas, le calcul du MAD effectué sur 3 réplicats seulement peut en quelque sorte « sous-estimer » la variabilité inter-réplicat, expliquant ainsi les différences observées entre les résultats des graphiques (non superposition des barres d'erreurs) et ceux du test de Mann-Whitney (différence non significative). Cela concerne les dates pour lesquelles 1 réplicat est éloigné des 2 autres, comme en mai 2008 à la station Sierroz.

Dans l'ensemble, peu de stations mettent en évidence une influence marquée de la nature du substrat (pas de différence significative dans 16 observations sur 27 ; nombre de cas où S.Nat.>S.Art./nombre d'observations : 3/27).

4. Comparaison des biofilms en fonction de la technique d'échantillonnage.

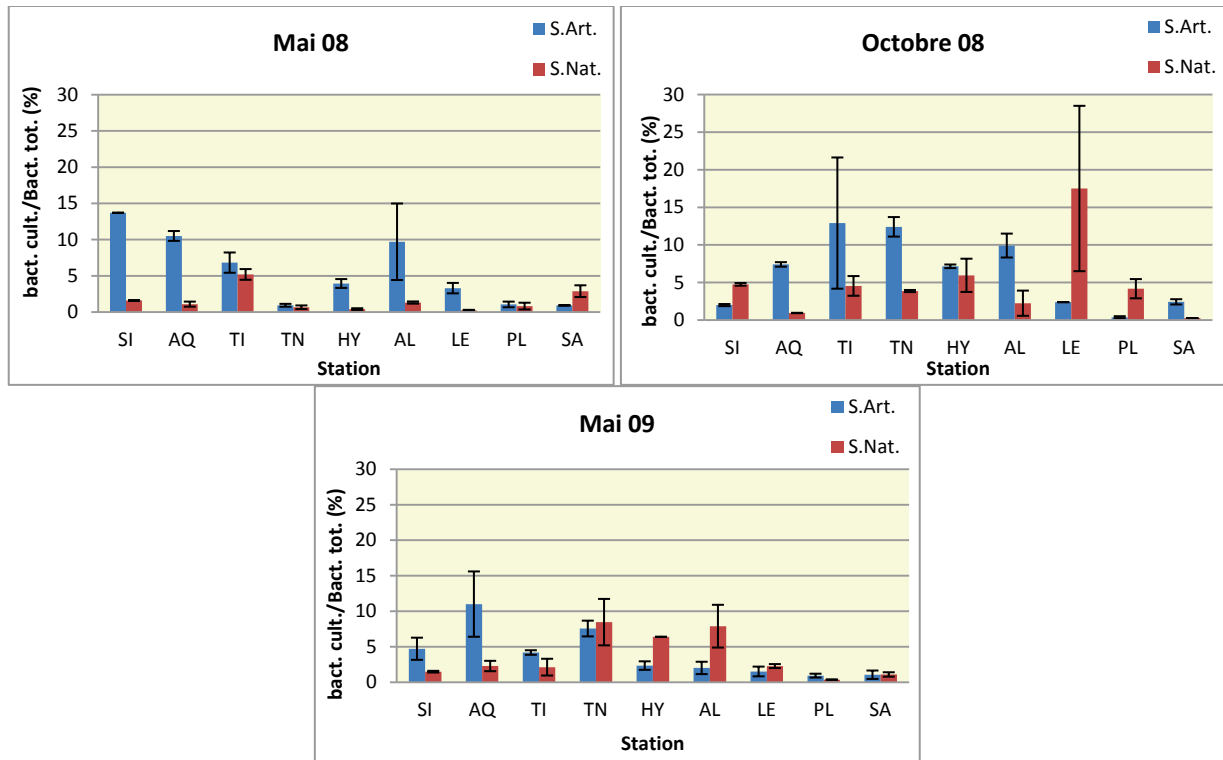


Figure 37 : Comparaison de la proportion de bactéries_{cultivables} (Bactéries_{cultivables}/Bactéries_{totales}) en fonction du type de substrat.

Codes des substrats : S.Art. : substrat artificiel ; S.Nat. : substrat naturel;

Codes des stations : SI : Sierroz, AQ : Aquarium, TI : Tillet, TN : Terre Nue, HY : Hyères, AL : Albanne, LE : Leyse, PL : Plage, SA : Savières.

Tableau 24: Comparaison de la proportion de bactéries_{cultivables} (p-values ; test de Mann Whitney ; Bactéries_{cultivables}/Bactéries_{totales})

A : en fonction du type de substrat pour chaque station et chaque campagne ;

B : entre les 2 campagnes effectuées en mai pour chaque station et par type de substrat).

La différence est significative pour p<0.05 (valeur en rouge et en gras).

STATION	A- Comparaison S.Art./S.Nat.			B- Comparaison des campagnes mai 08/mai 09	
	mai-08	oct-08	mai-09	S.Art.	S.Nat.
SIERROZ	0.5127	0.0495	0.1266	0.1266	0.2752
AQUARIUM	0.0495	0.0495	0.1266	0.8273	0.0495
TILLET	0.1266	0.2752	0.0495	0.0495	0.0495
TERRE NUE	0.5127	0.2752	0.8273	0.0495	0.0495
HYERES	0.5127	0.8273	0.0495	0.5127	0.0495
ALBANNE	0.0495	0.0495	0.5127	0.5127	0.0495
LEYSSE	0.0495	0.1266	0.8273	0.5127	0.0495
PLAGE	0.8273	0.0495	0.0495	0.8273	0.2752
SAVIERES	0.5127	0.0495	0.8273	0.2752	0.5127

Les proportions des bactéries_{cultivables} des biofilms développés sur les substrats artificiels ne sont pas significativement différentes entre les 2 campagnes effectuées au mois de mai, sauf pour les stations Tillet et Terre Nue (Figure 38 et Tableau 24B). A l'inverse des biofilms de la station Terre Nue, ceux de la station Tillet se caractérisent par une proportion de bactéries_{cultivables} supérieure en mai 2008.

Concernant les substrats naturels, toutes les stations, à l'exception de Sierroz, Plage et Savières, montrent une différence significative entre les deux années. La proportion de bactéries_{cultivables} est plus importante en 2009 sauf à la station Tillet.

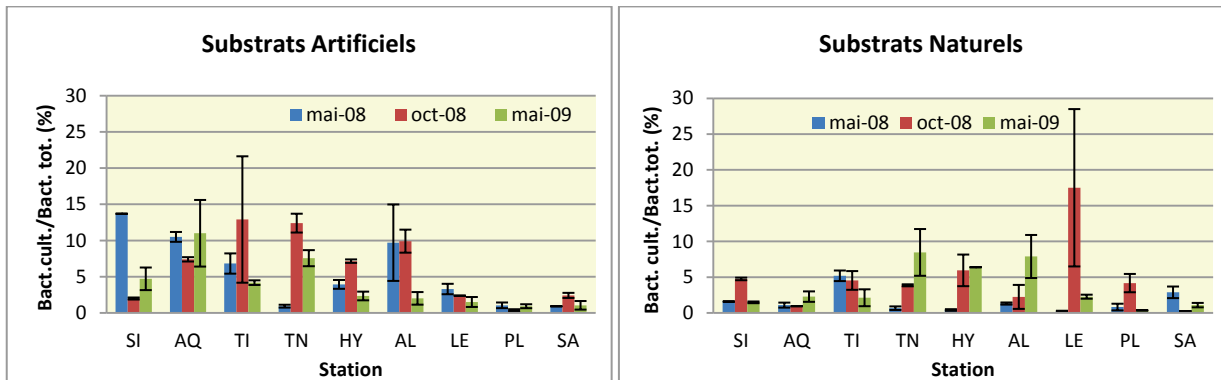


Figure 38: Comparaison de la proportion de bactéries_{cultivables} par type de substrats.
Codes des stations : SI : Sierroz, AQ : Aquarium, TI : Tillet, TN : Terre Nue, HY : Hyères, AL : Albanne, LE : Lysse, PL : Plage, SA : Savières.

Comme lors de la description globale du biofilm (poids sec, matière organique), la nature du substrat a aussi une importance marquée sur les concentrations de bactéries totales et cultivables. Par contre, lorsque l'on s'intéresse au rapport entre ces deux descripteurs, l'influence de la nature du substrat est beaucoup moins nette. La proportion de bactéries_{cultivables} est même supérieure pour les substrats artificiels lorsqu'une différence significative est présente.

Cette observation va dans le sens d'un biofilm plus jeune et plus cultivable sur les substrats artificiels. Une durée d'incubation des substrats artificiels de 14 jours n'est peut-être pas suffisante à l'obtention d'un biofilm mature.

L'utilisation des substrats artificiels permet également de diminuer la variabilité inter-réplicats de la concentration des bactéries_{totales}, mais pas de celle des bactéries_{cultivables}, ni de la proportion de ces dernières. Les substrats artificiels semblent aussi augmenter légèrement la variabilité inter-annuelle de la concentration des bactéries_{totales}, mais ils diminuent celle de la proportion de bactéries_{cultivables}. Quant à la variabilité inter-annuelle de la concentration des bactéries_{cultivables}, elle ne semble pas ou peu affectée par la nature du substrat.

4.3 Lpn et ses différents états physiologiques

4.3.1 Concentrations de Lpn_{totales}

Au cours de la première campagne, les triplicats obtenus avec les substrats artificiels sont généralement plus homogènes dans leur concentration de Lpn_{totales} (6 observations/9 ; Tableau 25). Pour les deux autres campagnes, l'effet du substrat est fortement dépendant de la station. Les substrats artificiels permettent de diminuer la variabilité dans 8 observations/18, tandis qu'ils l'augmentent dans 8 autres observations.

Il est donc difficile de conclure à un effet du type de substrat sur la variabilité inter-répliat de la concentration de Lpn_{totales} .

Tableau 25 : Evolution de l'hétérogénéité inter-réplicats de la concentration en Lpn_{totales} (Immuno) des biofilms en fonction du type de substrat par campagne et par station (CV_{MAD}). Nombre d'observations par campagne où le CV_{MAD} est équivalent entre les deux types de substrats ou inférieur sur les substrats artificiels.

Station	Mai 2008		Octobre 2008		Mai 2009	
	S. Artificiels	S. Naturels	S. Artificiels	S. Naturels	S. Artificiels	S. Naturels
Sierroz	40%	38%	25%	16%	17%	1%
Aquarium	9%	32%	0%	3%	21%	28%
Tillet	0%	26%	17%	8%	0%	15%
Terre Nue	33%	31%	0%	80%	14%	44%
Hyères	12%	20%	12%	29%	37%	7%
Albanne	0%	40%	11%	17%	9%	4%
Leyse	50%	30%	40%	39%	26%	11%
Plage	33%	42%	16%	3%	57%	20%
Savières	34%	50%	0%	24%	29%	45%
Nb SA~SN	2		1		1	
Nb SA<SN	6		4		4	

Comme pour la concentration des bactéries_{totales}, la concentration de Lpn_{totales} est supérieure dans le cas des biofilms développés sur les substrats naturels (nombre de cas où S.Nat.>S.Art./nombre d'observations : 27/27 ; Figure 39 et Tableau 36A).

Les gammes de concentrations des différentes formes de Lpn , ainsi que leurs proportions respectives sont indiquées dans le Tableau 26.

4. Comparaison des biofilms en fonction de la technique d'échantillonnage.

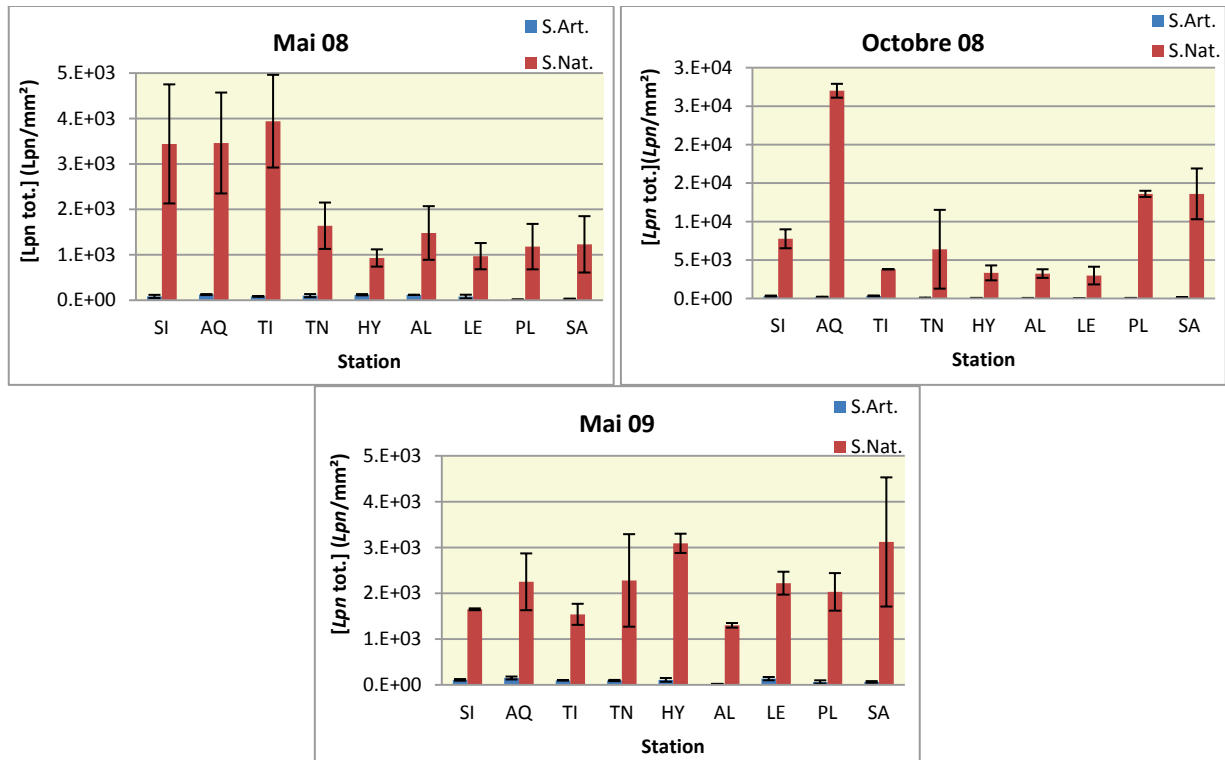


Figure 39: Comparaison de la concentration de Lpn_{totales} (immuno) en fonction du type de substrat.

Codes des substrats : S.Art. : substrat artificiel ; S.Nat. : substrat naturel;

Codes des stations : SI : Sierroz, AQ : Aquarium, TI : Tillet, TN : Terre Nue, HY : Hyères, AL : Albanne, LE : Leyse, PL : Plage, SA : Savières.

Tableau 26: Gamme de concentration des différentes formes de Lpn (totales, FISH) et de leurs proportions en fonction du type de substrat.

		Lpn totales (Lpn/mm ²)		%Lpn totales		Lpn FISH (Lpn FISH/mm ²)		% Lpn FISH		Lpn FISH/Lpn totales (%)	
		S. Artificiel	S. Naturel	S. Artificiel	S. Naturel	S. Artificiel	S. Naturel	S. Artificiel	S. Naturel	S. Artificiel	S. Naturel
mai-08	min	1.36E+01	9.30E+02	0.364	0.399	2.43E+01	1.11E+03	0.401	0.476	67.1	76.7
	max	1.25E+02	3.94E+03	1.98	2.31	3.86E+02	2.03E+04	4.58	14.9	477	418
oct-08	min	4.56E+01	2.98E+03	0.457	2.37	2.43E+01	7.31E+03	0.326	12.4	20.7	218
	max	3.36E+02	2.70E+04	8.11	8.16	6.19E+02	1.14E+05	4.52	32.8	821	742
mai-09	min	2.09E+01	1.30E+03	0.249	0.232	1.22E+01	4.99E+03	0.195	1.86	19.1	219
	max	1.50E+02	3.12E+03	1.36	1.5	3.29E+02	1.05E+05	2.48	32.8	358	3050

Tableau 27: Comparaison de la concentration de Lpn_{totales} (p-values ; test de Mann Whitney)
A : en fonction du type de substrat pour chaque station et chaque campagne ;
B : entre les 2 campagnes effectuées en mai pour chaque station et par type de substrat).
 La différence est significative pour $p < 0.05$ (valeur en rouge et en gras).

STATION	A- Comparaison S.Art./S.Nat.			B- Comparaison des campagnes mai 08/mai 09	
	mai-08	oct-08	mai-09	S.Art.	S.Nat.
SIERROZ	0.0495	0.0495	0.0495	0.5127	0.2752
AQUARIUM	0.0495	0.0495	0.0495	0.2752	0.1266
TILLET	0.0495	0.0495	0.0495	0.0495	0.0495
TERRE NUE	0.0495	0.0495	0.0495	0.8273	0.5127
HYERES	0.0495	0.0495	0.0495	0.8273	0.0495
ALBANNE	0.0495	0.0495	0.0495	0.0495	0.5127
LEYSSE	0.0495	0.0495	0.0495	0.1904	0.0495
PLAGE	0.0495	0.0495	0.0495	0.1266	0.1266
SAVIERES	0.0495	0.0495	0.0495	0.0495	0.2752

D'une année sur l'autre, les concentrations de Lpn_{totales} sont plutôt stables quel que soit le type de substrat considéré (Figure 40 et Tableau 27 B). Seules 3 stations sont significativement différentes dans chaque cas. Il s'agit des stations Tillet, Albanne et Savières pour les substrats artificiels et des stations Tillet, Hyères et Leysse pour les substrats naturels.

Le type de substrat n'a donc pas d'effet marqué sur la variabilité inter-annuelle de ce descripteur.

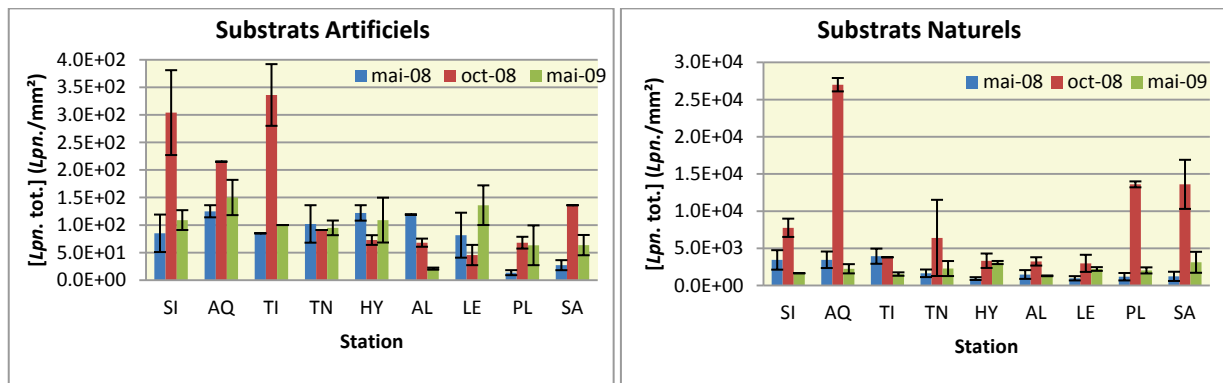


Figure 40 : Comparaison de la concentration en Lpn_{totales} (immuno) par type de substrat.
 Codes des stations : SI : Sierroz, AQ : Aquarium, TI : Tillet, TN : Terre Nue, HY : Hyères, AL : Albanne, LE : Leysse, PL : Plage, SA : Savières.

4.3.2 Proportions de Lpn_{totales}

L'influence de la technique d'échantillonnage a un effet très variable sur la proportion de Lpn_{totales} ($Lpn_{\text{totales}}/Bactéries_{\text{totales}}$; nombre de cas où S.Nat.>S.Art./nombre d'observations : 9/27 ; où S.Art.>S.Nat. : 5/27 ; Tableau 28). En mai 2008, les stations réagissent différemment. Puis au cours des deux autres campagnes, le type de substrat a un effet opposé sur l'homogénéité des biofilms : ceux échantillonnés sur les substrats artificiels sont plus homogènes (entre les triplicats) en octobre 2008, mais plus variables en mai 2009.

Tableau 28 : Evolution de la variabilité (MAD/Médiane) inter-réplicats de la proportion des Lpn_{totales} ($Lpn_{\text{totales}}/Bactéries_{\text{totales}}$) en fonction du type de substrat par campagne et par station (CV_{MAD}). Nombre d'observations par campagne où le CV_{MAD} est équivalent entre les deux types de substrats ou inférieur sur les substrats artificiels.

Station	Mai 2008		Octobre 2008		Mai 2009	
	S. Artificiels	S. Naturels	S. Artificiels	S. Naturels	S. Artificiels	S. Naturels
Sierroz	56%	18%	22%	31%	21%	10%
Aquarium	5%	5%	19%	54%	46%	31%
Tillet	1%	12%	7%	29%	24%	5%
Terre Nue	46%	0.5%	6%	34%	17%	6%
Hyères	14%	35%	19%	17%	11%	5%
Albanne	0.5%	0.5%	16%	59%	20%	19%
Leyse	29%	13%	50%	65%	24%	18%
Plage	31%	80%	9%	12%	39%	7%
Savières	19%	25%	15%	10%	29%	21%
Nb SA~SN	2		2		1	
Nb SA<SN	4		6		-	

Dans les biofilms étudiés ici, les Lpn_{totales} représentent entre 0.3 et 8.7% de l'ensemble des bactéries (Figure 41 ; Tableau 26 et Tableau 29A).

En mai 2008, ce rapport est du même ordre de grandeur quel que soit le type de substrat, sauf pour les stations Tillet, Leyse et Savières. Ce rapport est alors supérieur sur les substrats naturels pour les stations Tillet et Savières.

En octobre 2008, seuls les biofilms provenant de 3 stations (Sierroz, Tillet et Savières) ne présentent pas de différence significative entre les 2 types de substrat pour ce rapport. Dans tous les autres cas, ce rapport est supérieur dans les biofilms développés sur les substrats naturels.

En mai 2009, seules les stations Tillet et Hyères montrent une différence significative de ce rapport, avec là encore une proportion supérieure dans les biofilms des substrats naturels.

L'influence du type de substrat semble donc dépendant de la saison. En mai, le type de substrat a peu d'influence sur la proportion de Lpn_{totales} , tandis qu'en octobre 2008, les substrats naturels ont tendance à augmenter cette proportion.

4. Comparaison des biofilms en fonction de la technique d'échantillonnage.

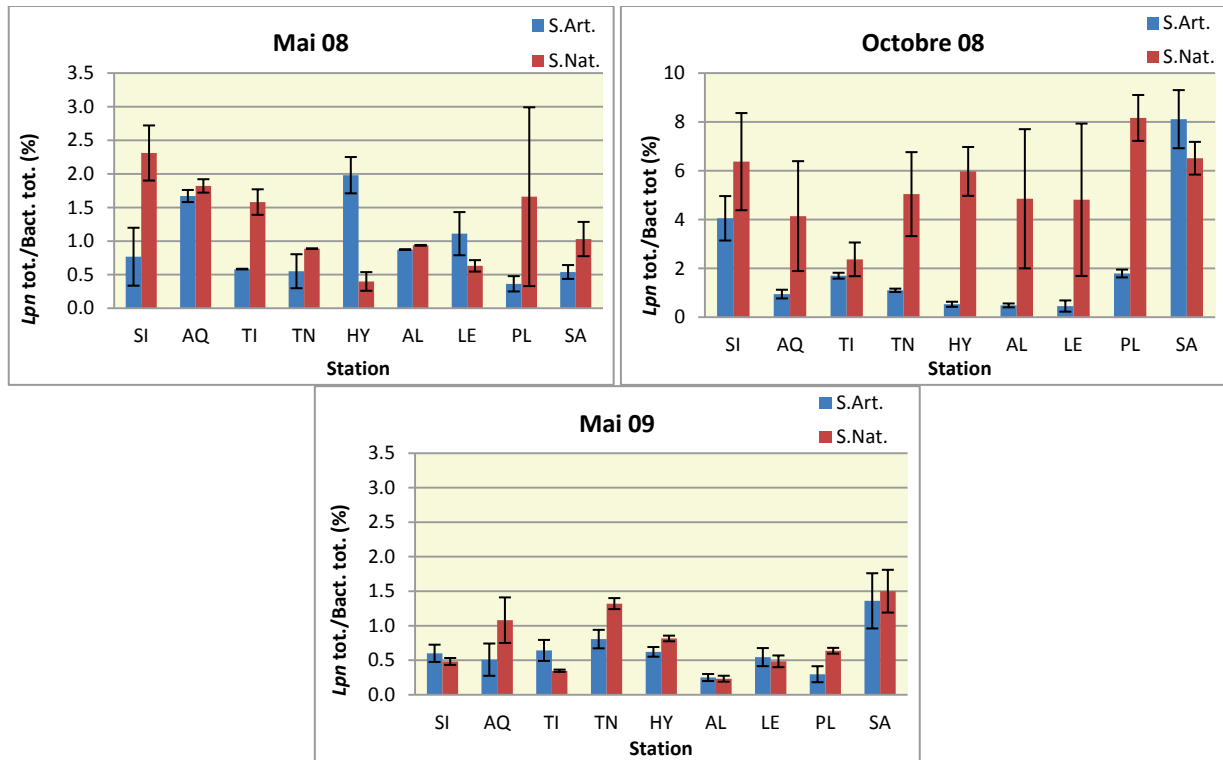


Figure 41: Comparaison de la proportion de Lpn_{totales} au sein de la communauté bactérienne ($Lpn_{\text{totales}}/Bactéries_{\text{totales}}$).

Codes des substrats : S.Art. : substrat artificiel ; S.Nat. : substrat naturel;

Codes des stations : SI : Sierroz, AQ : Aquarium, TI : Tillet, TN : Terre Nue, HY : Hyères, AL : Albanne, LE : Leyse, PL : Plage, SA : Savières.

Tableau 29: Comparaison de la proportion de Lpn_{totales} (p-values ; test de Mann Whitney ; $Lpn_{\text{totales}}/Bactéries_{\text{totales}}$).

A : en fonction du type de substrat pour chaque station et chaque campagne ;

B : entre les 2 campagnes effectuées en mai pour chaque station et par type de substrat).

La différence est significative pour $p < 0.05$ (valeur en rouge et en gras).

STATION	A- Comparaison S.Art./S.Nat.			B- Comparaison des campagnes mai 08/mai 09	
	mai-08	oct-08	mai-09	S.Art.	S.Nat.
SIERROZ	0.1266	0.1266	0.2752	0.8273	0.0495
AQUARIUM	0.1266	0.0495	0.1266	0.0495	0.0495
TILLET	0.0495	0.5127	0.0495	0.5127	0.0495
TERRE NUE	0.2752	0.0495	0.2752	0.2752	0.0495
HYERES	0.1266	0.0495	0.0495	0.2752	0.0495
ALBANNE	0.5127	0.0495	0.5127	0.1266	0.2752
LEYSSE	0.0495	0.0495	0.8273	0.0495	0.8273
PLAGE	0.2752	0.0495	0.5127	0.8273	0.5127
SAVIERES	0.0495	0.5127	0.8273	0.0495	0.2752

La comparaison inter-annuelle montre que les substrats naturels intensifient quelque peu l'effet de la nature du substrat sur les proportions de Lpn_{totales} : 5 stations (Sierroz, Aquarium, Tillet, Terre Nue et Hyères) présentent une différence significative avec les substrats naturels contre 3 seulement (Savières, Aquarium et Leyse) dans le cas des substrats artificiels (Figure 42 et Tableau 29B). On remarque également que ce rapport est maximal pour chaque station au cours de la campagne effectuée en octobre 2008 dans le cas des substrats naturels.

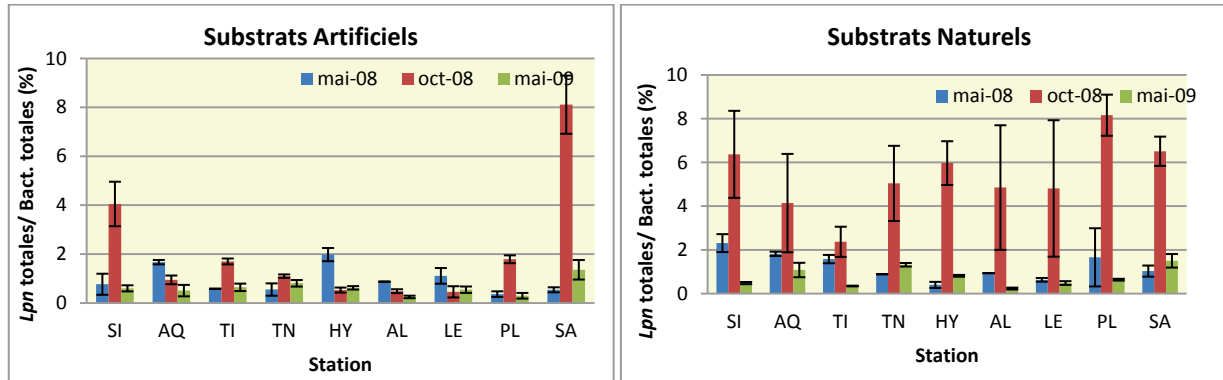


Figure 42 : Comparaison de la proportion de Lpn_{totales} ($Lpn_{\text{totales}}/Bactéries_{\text{totales}}$) par type de substrat. Codes des stations : SI : Sierroz, AQ : Aquarium, TI : Tillet, TN : Terre Nue, HY : Hyères, AL : Albanne, LE : Leyse, PL : Plage, SA : Savières.

4.3.3 Concentrations de Lpn_{FISH}

Quelle que soit la campagne considérée, il n'est pas possible de faire ressortir d'influence du type de substrat sur l'homogénéité inter-triplicats des concentrations de Lpn_{FISH} (Tableau 30). Sur l'ensemble des campagnes et des stations, le CV est équivalent dans 4 observations, inférieur sur les substrats artificiels dans 13 observations et donc supérieur sur les substrats naturels dans les 10 observations restantes.

Tableau 30 : Evolution de la variabilité (MAD/Médiane) inter-réplicats de la concentration en Lpn_{FISH} des biofilms en fonction du type de substrat par campagne et par station (CV_{MAD}). Nombre d'observations par campagne où le CV_{MAD} est équivalent entre les deux types de substrats ou inférieur sur les substrats artificiels.

Station	Mai 2008		Octobre 2008		Mai 2009	
	S. Artificiels	S. Naturels	S. Artificiels	S. Naturels	S. Artificiels	S. Naturels
Sierroz	0%	12%	10%	1%	0%	25%
Aquarium	0%	46%	34%	27%	22%	7%
Tillet	25%	57%	33%	53%	10%	32%
Terre Nue	25%	66%	60%	61%	32%	51%
Hyères	39%	3%	0%	16%	0%	12%
Albanne	17%	12%	5%	30%	18%	12%
Leyse	22%	3%	15%	18%	50%	25%
Plage	33%	20%	25%	55%	44%	28%
Savières	33%	12%	50%	4%	0%	11%
Nb SA~SN	1		2		1	
Nb SA<SN	4		4		5	

Les concentrations de *Lpn* dénombrées par la méthode FISH dépendent de la nature du substrat (Figure 43, Tableau 26 et Tableau 31A). Les concentrations sont significativement supérieures dans le cas des substrats naturels en comparaison à celles obtenues sur les substrats artificiels (dans 26 observations/27). Une station fait tout de même exception en mai 2008, car la différence observée à la station Terre Nue n'est pas significative.

On note également, qu'au cours des trois campagnes effectuées sur les substrats naturels, la concentration maximale est obtenue à la station Aquarium, c'est-à-dire au niveau de l'exutoire du réseau aixois recevant les eaux thermales contaminées.

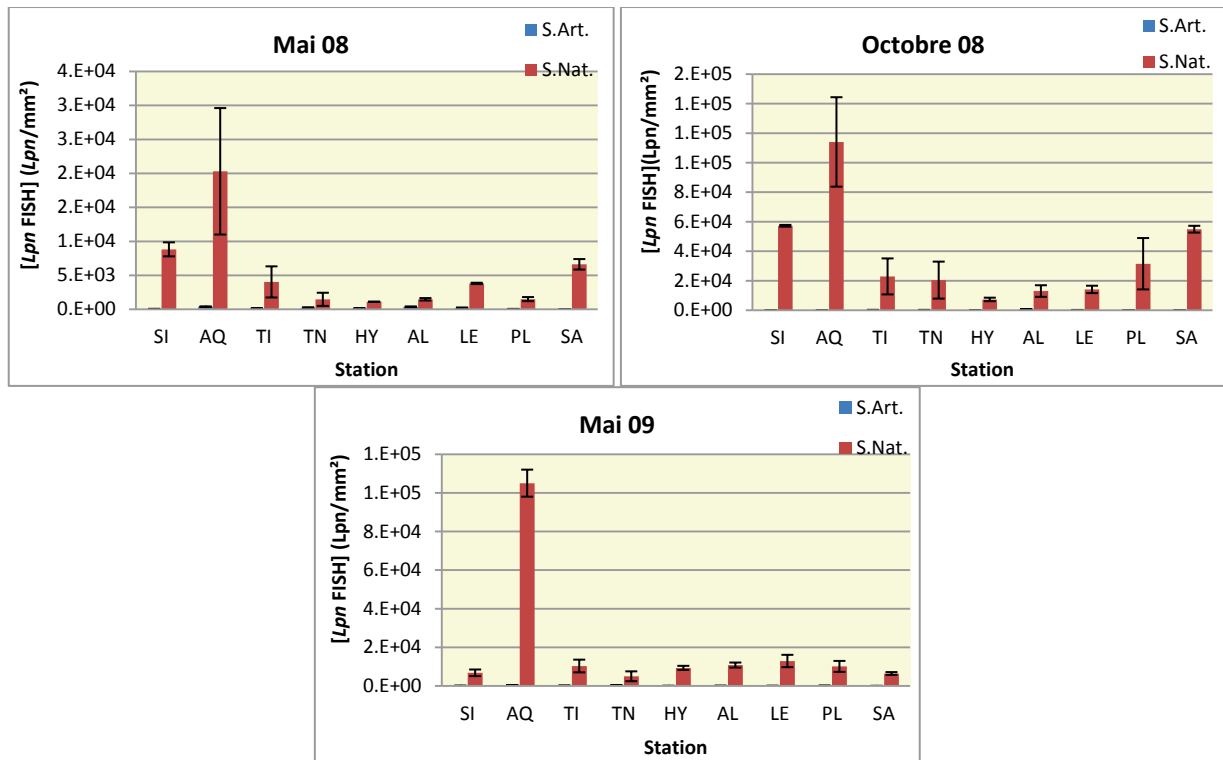


Figure 43: Comparaison de la concentration de *Lpn*_{FISH} en fonction du type de substrat.

Codes des substrats : S.Art. : substrat artificiel ; S.Nat. : substrat naturel;

Codes des stations : SI : Sierroz, AQ : Aquarium, TI : Tillet, TN : Terre Nue, HY : Hyères, AL : Albanne, LE : Laysse, PL : Plage, SA : Savières.

Tableau 31: Comparaison de la concentration de Lpn_{FISH} (p-values ; test de Mann Whitney)
A : en fonction du type de substrat pour chaque station et chaque campagne ;
B : entre les 2 campagnes effectuées en mai pour chaque station et par type de substrat).
 La différence est significative pour $p < 0.05$ (valeur en rouge et en gras).

STATION	A- Comparaison S.Art./S.Nat.			B- Comparaison des campagnes mai 08/mai 09	
	mai-08	oct-08	mai-09	S.Art.	S.Nat.
SIERROZ	0.0495	0.0495	0.0495	0.5127	0.8273
AQUARIUM	0.0495	0.0495	0.0495	0.8273	0.1266
TILLET	0.0495	0.0495	0.0495	0.6625	0.1266
TERRE NUE	0.1266	0.0495	0.0495	0.8273	0.2752
HYERES	0.0495	0.0495	0.0495	0.0809	0.0495
ALBANNE	0.0495	0.0495	0.0495	0.0495	0.0495
LEYSSE	0.0495	0.0495	0.0495	0.0809	0.0495
PLAGE	0.0495	0.0495	0.0495	0.1266	0.0495
SAVIERES	0.0495	0.0495	0.0495	0.1904	0.8273

L'étude inter-annuelle met en évidence une meilleure stabilité des concentrations de Lpn_{FISH} d'une année sur l'autre pour les substrats artificiels (Figure 44 et Tableau 31B). En effet, sur ces substrats, seule la station Albanne présente une différence significative entre les 2 années. En revanche, avec les substrats naturels, un plus grand nombre de stations met en évidence une différence de concentration de Lpn_{FISH} . Il s'agit des stations : Hyères, Albanne, Leyse et Plage.

L'utilisation des substrats artificiels aurait donc tendance à masquer la variabilité inter-annuelle des concentrations de Lpn_{FISH} .

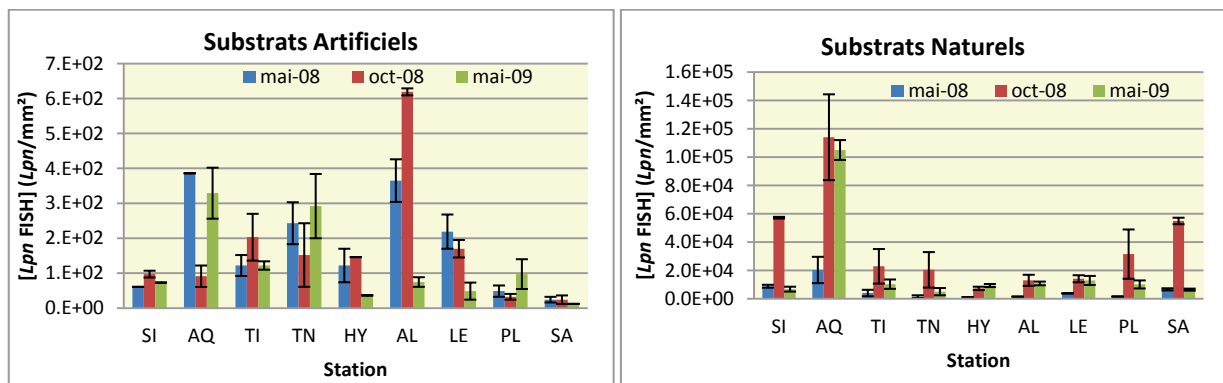


Figure 44 : Comparaison de la concentration en Lpn_{FISH} par type de substrat.
 Codes des stations : SI : Sierroz, AQ : Aquarium, TI : Tillet, TN : Terre Nue, HY : Hyères, AL : Albanne, LE : Leyse, PL : Plage, SA : Savières.

4.3.4 Proportions de Lpn_{FISH}

Dans la majorité des observations, l'utilisation des substrats artificiels permet d'obtenir une meilleure homogénéité entre les triplicats lorsque l'on considère la proportion de Lpn dénombrées par la méthode FISH au sein de la communauté bactérienne ($Lpn_{FISH}/Bactéries_{totales}$; Tableau 32). Il existe tout de même quelques exceptions, principalement durant la campagne de mai 2009, mais aussi aux stations Savières et Aquarium en octobre 2008.

**Tableau 32 : Evolution de la variabilité (MAD/Médiane) inter-réplicats de la proportion en Lpn_{FISH} ($Lpn_{FISH}/Bactéries_{totales}$) des biofilms en fonction du type de substrat par campagne et par station (CV_{MAD}).
Nombre d'observations par campagne où le CV_{MAD} est équivalent entre les deux types de substrats ou inférieur sur les substrats artificiels.**

Station	Mai 2008		Octobre 2008		Mai 2009	
	S. Artificiels	S. Naturels	S. Artificiels	S. Naturels	S. Artificiels	S. Naturels
Sierroz	9%	45%	3%	29%	5%	21%
Aquarium	13%	61%	53%	9%	26%	13%
Tillet	19%	3%	32%	51%	7%	8%
Terre Nue	18%	74%	57%	51%	13%	7%
Hyères	37%	51%	3%	29%	3%	47%
Albanne	7%	20%	2%	44%	14%	13%
Leyse	37%	3%	6%	19%	48%	10%
Plage	29%	5%	32%	52%	6%	25%
Savières	9%	37%	71%	31%	8%	22%
Nb SA~SN	-		1		3	
Nb SA<SN	6		6		4	

De la même manière que la concentration de Lpn_{FISH} varie en fonction du type de substrat échantillonné, la proportion de Lpn_{FISH} dans la communauté bactérienne est supérieure sur les substrats naturels durant les campagnes d'octobre 2008 et de mai 2009 (Figure 45, Tableau 29 et Tableau 33A). Pour cette dernière, seule la station Tillet fait exception en ne présentant pas de différence significative entre les 2 types de substrat.

La première campagne (mai 2008) montre des résultats plus variables en fonction des stations. Les stations Tillet, Terre-Nue, Leyse et Plage ne mettent pas en évidence de différence en fonction de la nature du substrat. Les stations Sierroz, Aquarium et Savières montrent des proportions supérieures sur les substrats naturels tandis que les stations Hyères et Albanne montrent des proportions supérieures sur les substrats artificiels.

Sur l'ensemble des données, la tendance rejoint celle des deux dernières campagnes : la proportion de Lpn_{FISH} est généralement significativement supérieure sur les substrats naturels (nombre de cas où S.Nat.>S.Art./nombre d'observations : 20/27).

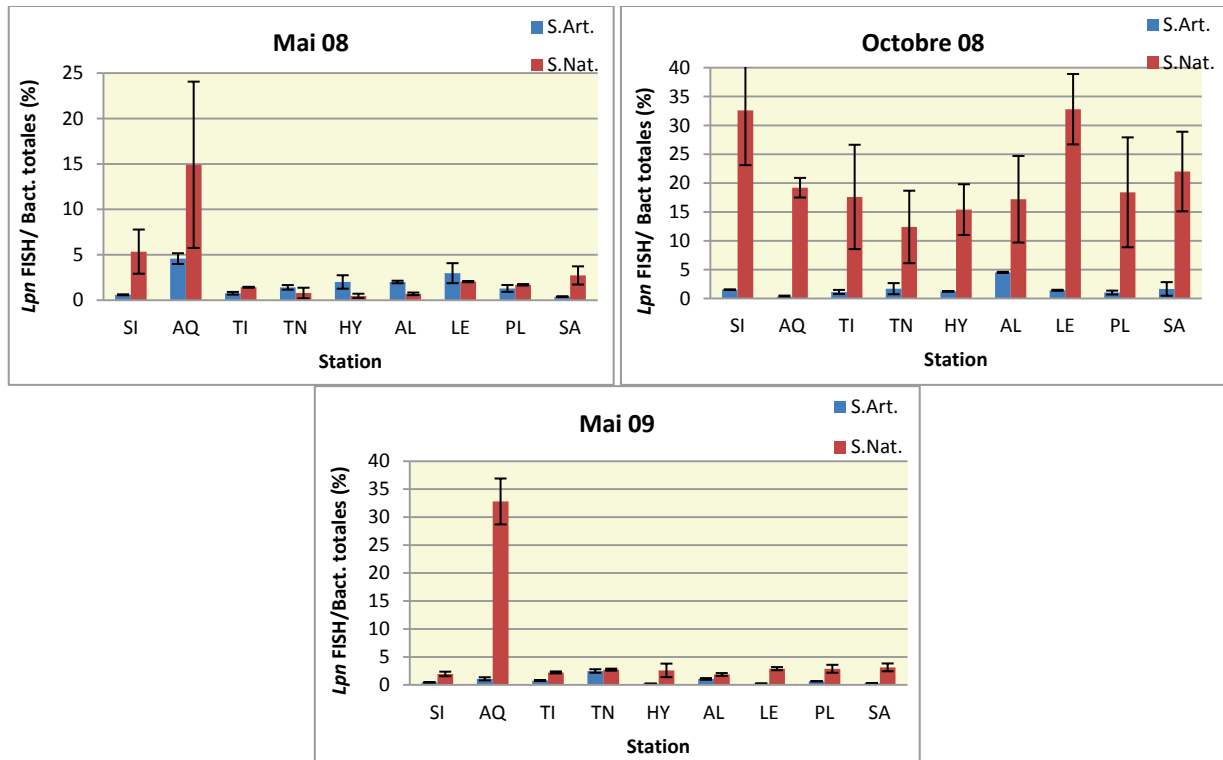


Figure 45: Comparaison de la proportion de Lpn_{FISH} ($Lpn_{FISH}/Bactéries_{totales}$) en fonction du type de substrat.
Codes des substrats : S.Art. : substrat artificiel ; S.Nat. : substrat naturel;
Codes des stations : SI : Sierroz, AQ : Aquarium, TI : Tillet, TN : Terre Nue, HY : Hyères, AL : Albanne, LE : Leyse, PL : Plage, SA : Savières.

Tableau 33: Comparaison de la proportion de Lpn_{FISH} (p-values ; test de Mann Whitney ; $Lpn_{FISH}/Bactéries_{totales}$)
A : en fonction du type de substrat pour chaque station et chaque campagne ;
B : entre les 2 campagnes effectuées en mai pour chaque station et par type de substrat).
La différence est significative pour $p < 0.05$ (valeur en rouge et en gras).

STATION	A- Comparaison S.Art./S.Nat.			B- Comparaison des campagnes mai 08/mai 09	
	mai-08	oct-08	mai-09	S.Art.	S.Nat.
SIERROZ	0.0495	0.0495	0.0495	0.0495	0.2752
AQUARIUM	0.0495	0.0495	0.0495	0.0495	0.1266
TILLET	0.1266	0.0495	0.0495	0.8273	0.0495
TERRE NUE	0.2752	0.0495	0.2752	0.8273	0.0495
HYERES	0.0495	0.0495	0.0495	0.0495	0.0495
ALBANNE	0.0495	0.0495	0.0495	0.0495	0.0495
LEYSSE	0.5127	0.0495	0.0495	0.0495	0.5127
PLAGE	0.1266	0.0495	0.0495	0.0495	0.1266
SAVIERES	0.0495	0.0495	0.0495	0.1266	0.5127

D'une année à l'autre, la proportion de Lpn_{FISH} dans la communauté bactérienne des biofilms est moins variable sur les substrats naturels que sur les substrats artificiels (Figure 46 et Tableau 33B). En effet, on dénote une différence significative pour les stations Sierroz, Aquarium, Hyères, Albanne, Leyse et Plage sur les substrats artificiels et pour les stations Tillet, Terre Nue, Hyères et Albanne uniquement sur les substrats naturels.

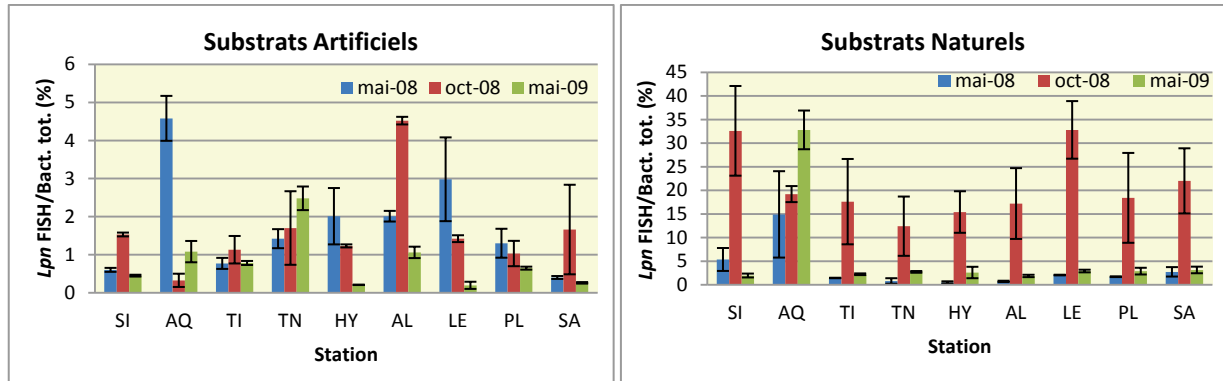


Figure 46 : Comparaison de la proportion de Lpn_{FISH} ($Lpn_{FISH}/Bactéries_{totales}$) pour chaque type de substrat. Codes des stations : SI : Sierroz, AQ : Aquarium, TI : Tillet, TN : Terre Nue, HY : Hyères, AL : Albanne, LE : Leyse, PL : Plage, SA : Savières.

4.3.5 Rapport entre $Lpn_{totales}$ et Lpn_{FISH}

Comme cela a déjà été le cas pour différents descripteurs, la méthode d'échantillonnage n'a pas d'effet marqué sur l'homogénéité inter-triplicats (Tableau 34). Sur l'ensemble des stations et des campagnes, la variabilité inter-réplicats est équivalente pour 7 observations, inférieure sur les substrats artificiels pour 12 observations et inférieure sur les substrats naturels pour les 8 observations restantes.

Tableau 34: Evolution de la variabilité (MAD/Médiane) inter-réplicats du rapport entre les Lpn_{FISH} et les $Lpn_{totales}$ des biofilms en fonction du type de substrat par campagne et par station (CV_{MAD}). Nombre d'observations par campagne où le CV_{MAD} est équivalent entre les deux types de substrats ou inférieur sur les substrats artificiels.

Station	Mai 2008		Octobre 2008		Mai 2009	
	S. Artificiels	S. Naturels	S. Artificiels	S. Naturels	S. Artificiels	S. Naturels
Sierroz	40%	58%	10%	17%	0%	8%
Aquarium	57%	24%	10%	29%	17%	33%
Tillet	25%	22%	2%	20%	39%	12%
Terre Nue	72%	50%	40%	43%	0%	12%
Hyères	36%	12%	4%	16%	19%	2%
Albanne	36%	40%	35%	52%	6%	44%
Leyse	12%	18%	29%	15%	30%	11%
Plage	0%	12%	51%	56%	55%	2%
Savières	11%	12%	14%	19%	3%	27%
Nb SA~SN	4		3		-	
Nb SA<SN	2		5		5	

Le comportement de ce rapport en fonction de la nature du substrat est très variable en fonction de la campagne d'échantillonnage (Figure 47, Tableau 29 et Tableau 35A ; nombre de cas où $S.Nat. > S.Art.$ / nombre d'observations : 12/27).

En mai 2008, seules les stations Tillet et Leyse montrent une différence significative en fonction du type de substrat. Le rapport est alors supérieur sur les substrats artificiels à la station Tillet, tandis qu'il est supérieur sur les substrats naturels à la station Leyse.

En octobre 2008, quatre stations présentent une différence significative en fonction du type de substrat. Il s'agit des stations Sierroz, Aquarium, Tillet et Savières. Pour ces stations les rapports sont supérieurs dans le cas des biofilms naturels.

Enfin, en mai 2009, seules deux stations (Terre Nue et Plage) présentent un rapport $Lpn_{FISH}/Lpn_{totales}$ équivalent. Pour toutes les autres stations, et comme précédemment, ce rapport est supérieur dans le cas des substrats naturels. L'échantillonnage des biofilms par la technique des substrats naturels semble donc favorable aux Lpn dénombrées par la technique FISH par rapport à aux Lpn dénombrées en immunofluorescence.

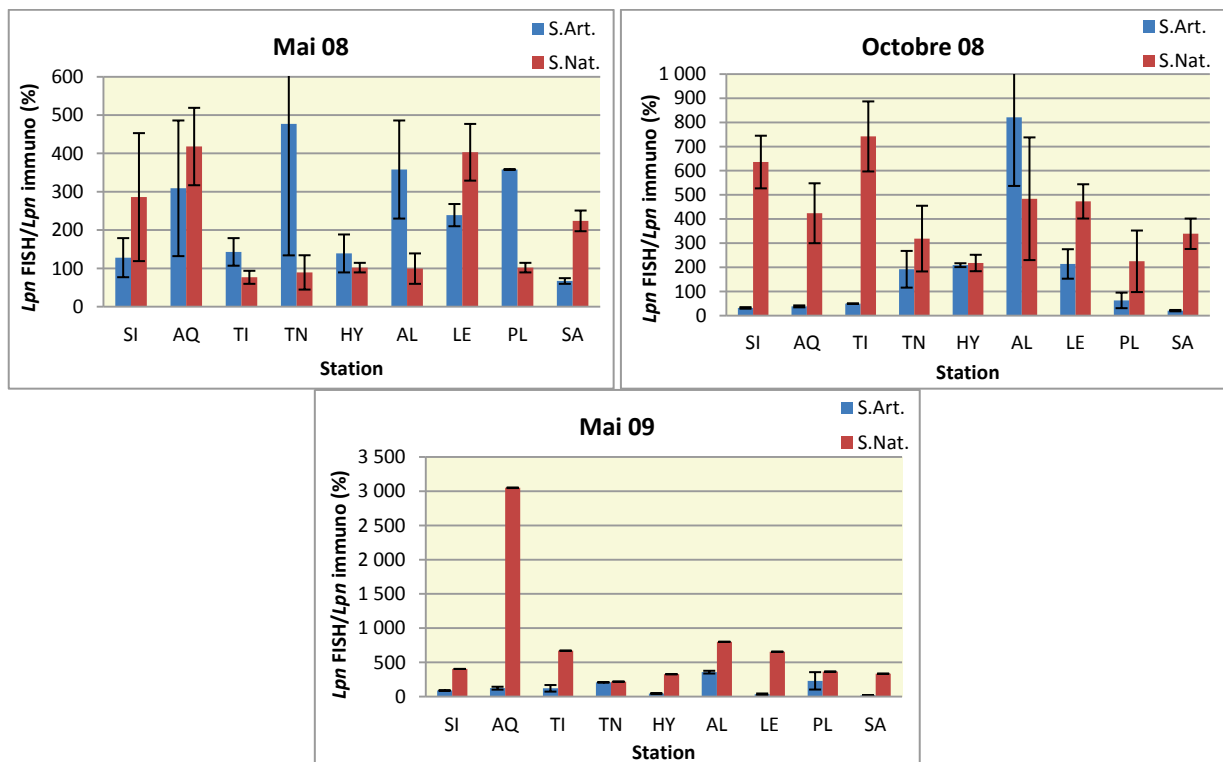


Figure 47: Comparaison du rapport $Lpn_{FISH} / Lpn_{totales}$ en fonction du type de substrat.
 Codes des substrats : S.Art. : substrat artificiel ; S.Nat. : substrat naturel;
 Codes des stations : SI : Sierroz, AQ : Aquarium, TI : Tillet, TN : Terre Nue, HY : Hyères, AL : Albanne,
 LE : Leyse, PL : Plage, SA : Savières.

Tableau 35: Comparaison du rapport $Lpn_{FISH} / Lpn_{totales}$ (p-values ; test de Mann Whitney)
A : en fonction du type de substrat pour chaque station et chaque campagne ;
B : entre les 2 campagnes effectuées en mai pour chaque station et par type de substrat).
 La différence est significative pour $p < 0.05$ (valeur en rouge et en gras).

STATION	A- Comparaison S.Art./S.Nat.			B- Comparaison des campagnes mai 08/mai 09	
	mai-08	oct-08	mai-09	S.Art.	S.Nat.
SIERROZ	0.2752	0.0495	0.0495	0.2752	0.2752
AQUARIUM	0.2752	0.0495	0.0495	0.2752	0.0495
TILLET	0.0495	0.0495	0.0495	0.5127	0.0495
TERRE NUE	0.1266	0.2752	0.8273	0.5127	0.1266
HYERES	0.3827	0.8273	0.0495	0.0495	0.0495
ALBANNE	0.2752	0.1266	0.0495	1.0000	0.0809
LEYSSE	0.0495	0.2752	0.0495	0.0495	0.5127
PLAGE	0.5127	0.1266	0.0809	0.5127	0.2752
SAVIERES	0.2752	0.0495	0.0495	0.0495	0.8273

Quelle que soit la nature du substrat échantillonné, le rapport $Lpn_{FISH}/Lpn_{totales}$ est relativement stable d'une année sur l'autre (Figure 48 et Tableau 35B). Dans chaque cas, seules 3 stations voient ce rapport changer d'une année sur l'autre. Il s'agit des stations Hyères, Leyse et Savières pour les substrats artificiels et Aquarium, Tillet et Hyères pour les substrats naturels.

L'utilisation des substrats artificiels n'a donc pas d'influence sur la stabilité inter-annuelle de ce rapport. Ce rapport est généralement maximal durant les campagnes des mois de mai (2008 ou 2009).

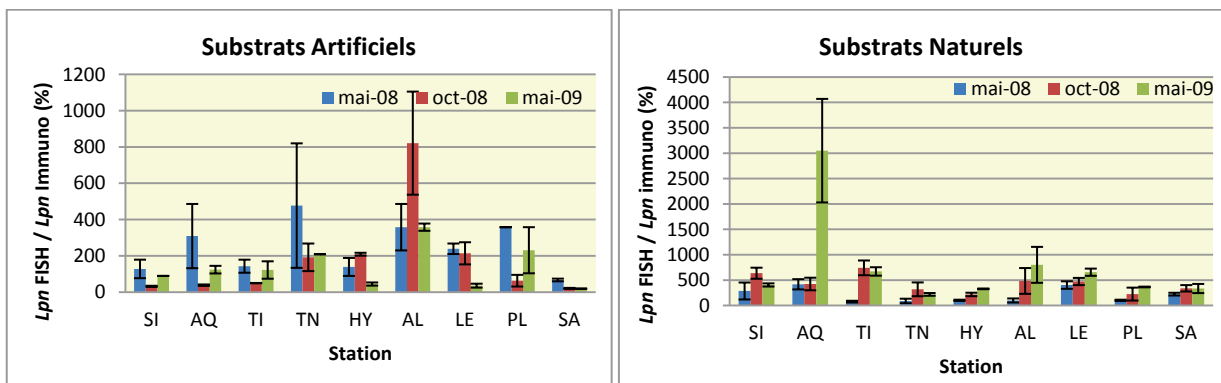


Figure 48 : Comparaison du rapport $Lpn_{FISH} / Lpn_{totales}$ par type de substrat.
 Codes des stations : SI : Sierroz, AQ : Aquarium, TI : Tillet, TN : Terre Nue, HY : Hyères, AL : Albanne, LE : Leyse, PL : Plage, SA : Savières.

4.3.6 Concentration de *Lpn*_{cultivables}

Comme pour la communauté bactérienne dans son ensemble, *Lpn* a également été dénombrée par la méthode de culture (Tableau 36). Les formes cultivables de *Lpn* sont rarement présentes dans les échantillons, à l'exception de ceux provenant de la station Aquarium. La concentration à cette station est supérieure dans le cas des biofilms échantillonnés sur les substrats naturels, la différence est significative pour les 2 campagnes effectuées en mai. On note également la présence de quelques colonies dans le cas de la campagne effectuée en mai 2008 sur les lames incubées aux stations Plage et Albanne et pour la campagne d'octobre 2008 au niveau la station Leysse.

**Tableau 36 : Comparaison de la concentration et de la proportion de *Lpn*_{cultivables} ($Lpn_{\text{cultivables}} / Lpn_{\text{totales}}$) en fonction du type de substrat (p-values ; test de Mann Whitney).
La différence est significative pour $p < 0.05$ (valeur en rouge et en gras).**

Campagne	Station	Concentrations de <i>Lpn</i> _{cultivables}			Proportions de <i>Lpn</i> _{cultivables}		
		S.Art. (UFC/mm ²)	S.Nat. (UFC/mm ²)	p value	S.Art. (%)	S. Nat. (%)	p value
mai-08	Aquarium	0.032	5.34	0.0495	0.04	0.084	0.0495
	Albanne	0.019	-	0.1904	0.037	-	0.1904
	Plage	0.006	-	0.1904	0.014	-	0.1904
oct-08	Aquarium	3.8	7.36	0.2752	1.2	0.029	0.0495
	Leysse	0.006	-	0.1904	0.014	-	0.1904
mai-09	Aquarium	1.27	7.5	0.0495	0.478	0.333	0.2752

L'absence de colonies pour certaines stations peut toutefois provenir d'un problème de compétition avec d'autres espèces bactériennes lors de la culture. En effet, on déplore une flore annexe très développée sur les boîtes de culture dans les cas suivants : Sierroz, Tillet, Leysse et Hyères en mai 2008 sur les substrats artificiels, Savières, Sierroz, Tillet et Terre Nue en mai 2008 sur les substrats naturels et à la station Tillet en octobre 2008 sur les substrats artificiels.

La forme cultivable de *Lpn* représente une fraction plus importante des *Lpn*_{totales} dans les biofilms développés sur les substrats naturels à la station Aquarium en mai 2008, mais c'est l'inverse lors de la campagne d'octobre 2008. En mai 2009, la différence n'est pas significative (Tableau 36).

Les différences ainsi obtenues peuvent provenir de facteurs environnementaux qui varient d'une campagne à l'autre, et lors des saisons. La température de l'eau et la concentration des nutriments peuvent faire partie de ces facteurs.

Comme pour les bactéries_{totales}, l'utilisation des substrats artificiels pour l'échantillonnage des biofilms engendre une sous-estimation des concentrations de Lpn_{totales} , des Lpn_{FISH} et des $Lpn_{\text{cultivables}}$. Mais la différence est moins fréquente lorsque l'on considère la proportion de Lpn_{totales} .

Il est tout de même important de remarquer, que des $Lpn_{\text{cultivables}}$ sont dénombrées dans un plus grand nombre de stations lors de l'utilisation des substrats artificiels. Il semble donc que lorsque la concentration de $Lpn_{\text{cultivables}}$ est faible, elle n'est détectée que sur les substrats artificiels. Sa disparition sur les substrats naturels peut provenir de l'augmentation de la compétition avec les espèces bactériennes des biofilms matures, mais aussi d'un environnement moins favorable au maintien de la forme cultivable. Par contre, dans le cas d'une présence permanente, comme à la station Aquarium, l'échantillonnage des substrats naturels est plus représentatif de l'historique à plus long terme de cette présence.

Le calcul du rapport entre les Lpn_{FISH} et les Lpn_{totales} est censé donner une indication de l'importance de la fraction active des Lpn du biofilm. Or, dans la majorité des observations effectuées ici, ce rapport est fortement supérieur à 100%. C'est peut-être en raison d'un problème de spécificité de la sonde utilisée en FISH associé à une présence plus importante, dans les biofilms plus âgés, de cellules impliquées dans le marquage non-spécifique (Willks & Keevil, 2006). La présence plus importante de particules interférant avec le marquage (fluorescence de la matière organique lors des comptages en immunofluorescence) peut également engendrer des erreurs lors des comptages conduisant à ces valeurs aberrantes.

Seule la variabilité inter-réplicats de la proportion de Lpn_{FISH} est influencée par la nature du substrat, et augmente sur les substrats naturels.

La variabilité inter-annuelle n'est pas affectée par la nature du substrat dans le cas des concentrations de Lpn (totales et FISH), ni dans celui du rapport $Lpn_{\text{FISH}}/Lpn_{\text{totales}}$. Par contre, l'effet est différent sur les proportions des différentes formes de Lpn . L'utilisation des substrats artificiels diminuent cette variabilité dans le cas de la proportion de Lpn_{totales} et l'augmentent dans le cas de la proportion de Lpn_{FISH} .

4.4 Comparaison de la colonisation des biofilms par les protistes

4.4.1 Concentrations des amibes

L'utilisation des substrats artificiels permet d'améliorer l'homogénéité entre les réplicats lors de l'estimation de la concentration des amibes. Mais ceci est principalement valable pour les campagnes des mois de mai 2008 et 2009 (Tableau 37).

En octobre 2008, les résultats dépendent de la station considérée. En effet, l'utilisation des substrats artificiels améliore l'homogénéité aux stations Plage, Terre Nue et Albanne en octobre 2008. Au contraire, ils favorisent l'hétérogénéité aux stations Tillet, Hyères et Savières. Dans les autres cas, le type de substrat n'a pas d'influence. En octobre 2008, trois stations n'ont pas d'amibes, expliquant l'absence de valeur du CV_{MAD} .

Tableau 37 : Evolution de la variabilité (MAD/Médiane) inter-réplicats des concentrations d'amibes en fonction du type de substrat par campagne et par station (CV_{MAD}). Nombre d'observations par campagne où le CV_{MAD} est équivalent entre les deux types de substrats ou inférieur sur les substrats artificiels.

Station	Mai 2008		Octobre 2008		Mai 2009	
	S. Artificiels	S. Naturels	S. Artificiels	S. Naturels	S. Artificiels	S. Naturels
Sierroz	20%	42%	2%	-	20%	49%
Aquarium	34%	80%	27%	-	2%	6%
Tillet	15%	37%	25%	1%	9%	100%
Terre Nue	12%	32%	0%	72%	50%	100%
Hyères	63%	21%	60%	22%	39%	2%
Albanne	60%	65%	25%	40%	27%	16%
Leyse	17%	77%	17%	-	17%	12%
Plage	40%	33%	33%	89%	16%	39%
Savières	25%	51%	33%	13%	7%	25%
Nb SA~SN	2		-		2	
Nb SA<SN	6		3 (/6 observations)		5	

Les gammes des concentrations des amibes et des flagellés sont indiquées dans le Tableau 38.

La concentration des amibes est généralement supérieure dans les biofilms des substrats naturels (nombre de cas où $S.Nat. > S.Art.$ / nombre d'observations : 22/27 ; Figure 49 et Tableau 39A). Quelques stations font tout de même exception ($S.Nat. \sim S.Art.$). Il s'agit des stations Aquarium et Leyse en octobre 2008 et des stations Aquarium, Tillet et Terre Nue en mai 2009. Les concentrations maximales sont observées aux stations Aquarium en mai 2008 et Plage en octobre 2008.

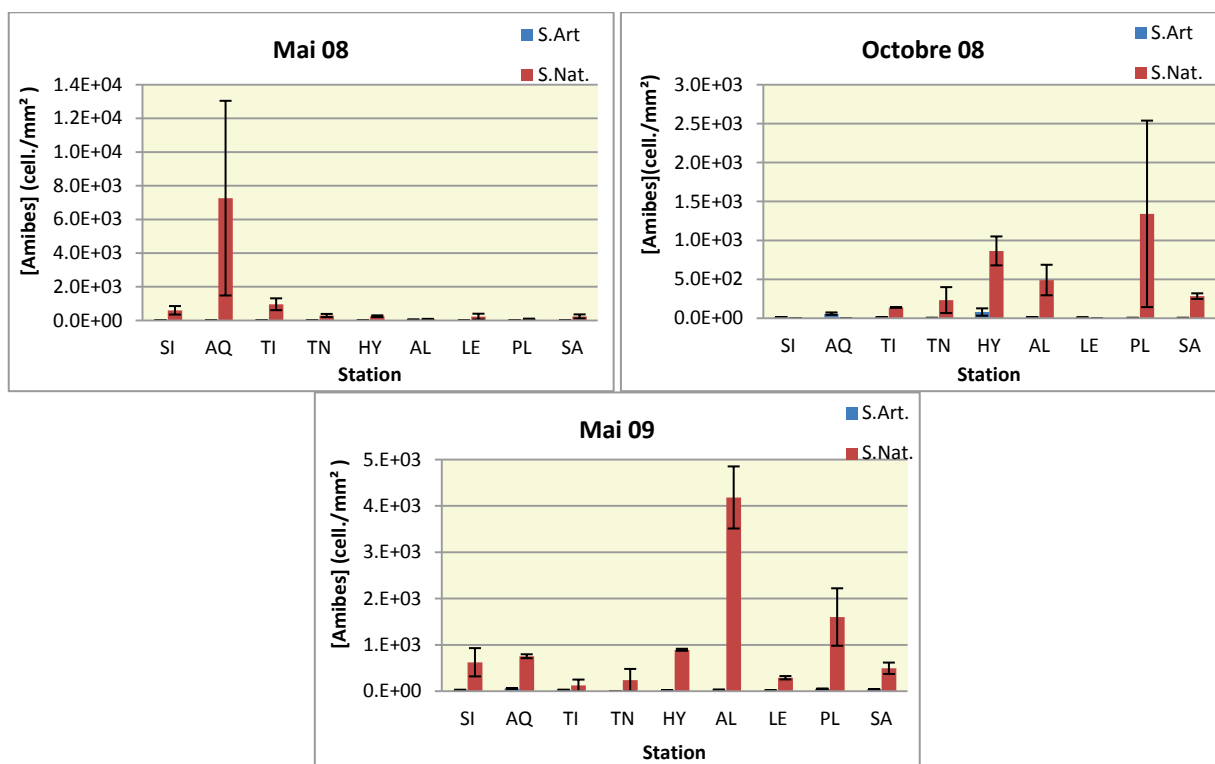


Figure 49 : Comparaison de la concentration en amibes en fonction du type de substrat.
Codes des substrats : S.Art. : substrat artificiel ; S.Nat. : substrat naturel;
Codes des stations : SI : Sierroz, AQ : Aquarium, TI : Tillet, TN : Terre Nue, HY : Hyères, AL : Albanne, LE : Leyse, PL : Plage, SA : Savières.

Tableau 38: Gammes des concentrations des protistes (amibes et flagellés) par campagne en fonction du type de substrat.

		Amibes (cell/mm ²)		Flagellés (cell/mm ²)	
		S. Artificiel	S. Naturels	S. Artificiel	S. Naturels
mai-08	min	3.94E+00	7.79E+01	1.70E+00	1.69E+01
	max	3.94E+01	7.26E+03	9.37E+01	4.74E+02
oct-08	min	3.94E+00	0.00E+00	4.26E+00	1.06E+02
	max	7.89E+01	1.34E+03	2.77E+01	2.17E+03
mai-09	min	2.63E+00	1.25E+02	6.39E+00	0.00E+00
	max	5.78E+01	4.18E+03	8.09E+01	1.11E+03

Tableau 39: Comparaison de la concentration des amibes (p-values ; test de Mann Whitney)

A : en fonction du type de substrat pour chaque station et chaque campagne ;

B : entre les 2 campagnes effectuées en mai pour chaque station et par type de substrat).

La différence est significative pour p<0.05 (valeur en rouge et en gras).

STATION	A- Comparaison S.Art./S.Nat.			B- Comparaison des campagnes mai 08/mai 09	
	mai-08	oct-08	mai-09	S.Art.	S.Nat.
SIERROZ	0.0495	0.0495	0.0495	0.0495	0.5127
AQUARIUM	0.0495	0.5127	0.5127	0.0495	0.0495
TILLET	0.0495	0.0495	0.5127	0.0495	0.1266
TERRE NUE	0.0495	0.0495	0.5127	0.0495	0.5127
HYERES	0.0495	0.0495	0.0495	0.6625	0.0495
ALBANNE	0.0495	0.0495	0.0495	0.8273	0.0495
LEYSSE	0.0495	0.5127	0.0495	0.0495	0.5127
PLAGE	0.0495	0.0495	0.0495	0.0495	0.0495
SAVIERES	0.0495	0.0495	0.0495	0.5127	0.5127

Lorsque l'on s'intéresse à la stabilité d'une année sur l'autre (Figure 50 et Tableau 39B), on remarque que les substrats naturels diminuent l'hétérogénéité inter-annuelle : 4 stations présentent une différence significative entre les deux mois de mai (Aquarium, Hyères, Albanne et Plage), contre 6 stations avec les substrats artificiels (Sierroz, Aquarium, Tillet, Terre Nue, Leysse et Plage).

Quelle que soit la nature de substrat, les plus fortes concentrations en amibes sont observées en mai (2008 ou 2009 selon les stations). Seule la station Hyères fait exception lors de l'échantillonnage des substrats artificiels avec une concentration maximale en octobre 2008.

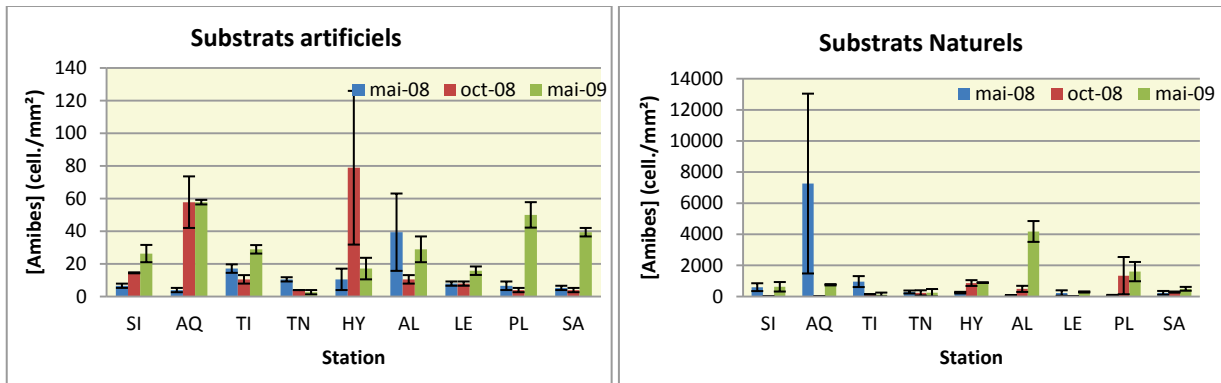


Figure 50 : Comparaison de la concentration des amibes par type de substrat.

Codes des stations : SI : Sierroz, AQ : Aquarium, TI : Tillet, TN : Terre Nue, HY : Hyères, AL : Albanne, LE : Laysse, PL : Plage, SA : Savières.

4.4.2 Concentrations des ciliés

A l'inverse, les ciliés sont uniquement présents dans les biofilms développés sur les substrats artificiels, même si leur présence reste rare (Tableau 40). Ils peuvent être présents occasionnellement dans les biofilms des substrats naturels, mais uniquement dans l'un des réplicats. La valeur médiane ne permet donc pas de les visualiser, mais ceci permet d'expliquer l'absence de significativité de la différence de concentration selon le substrat.

Tableau 40: Comparaison de la concentration de ciliés en fonction du type de substrat (p-values ; test de Mann Whitney).

La différence est significative pour $p < 0.05$ (valeur en rouge et en gras).

Campagne	Station	Concentrations de <i>ciliés</i>		
		S.Art. (cell./mm ²)	S.Nat. (cell./mm ²)	p value
mai-08	Albanne	4.58E+06	0	0.1904
oct-08	Sierroz	4.58E+06	0	0.1904
	Hyères	2.29E+06	0	0.1904
mai-09	Sierroz	1.37E+06	0	0.2752
	Hyères	4.58E+06	0	0.1904

En raison de la fréquence d'observation des ciliés dans les biofilms, l'analyse des données en fonction du type de substrat ne peut pas être plus poussée. Les biofilms ne semblent pas favorables à la présence de ce groupe de protistes, quel que soit le type de substrat échantillonné. Il est possible qu'ils soient plutôt présents dans la colonne d'eau et qu'ils utilisent le biofilm comme source de nourriture. Malgré tout, les biofilms jeunes, échantillonnés sur les substrats artificiels, peuvent occasionnellement abriter ce groupe d'organismes.

4.4.3 Concentrations des flagellés

A quelques exceptions près, l'utilisation des substrats artificiels permet d'obtenir une meilleure homogénéité inter-réplicats des concentrations de flagellés (Tableau 41).

Tableau 41 : Evolution de la variabilité (MAD/Médiane) inter-réplicats des concentrations en flagellés des biofilms en fonction du type de substrat par campagne et par station (CV_{MAD}). Nombre d'observations par campagne où le CV_{MAD} est équivalent entre les deux types de substrats ou inférieur sur les substrats artificiels.

Station	Mai 2008		Octobre 2008		Mai 2009	
	S. Artificiels	S. Naturels	S. Artificiels	S. Naturels	S. Artificiels	S. Naturels
Sierroz	33%	68%	9%	100%	0%	32%
Aquarium	20%	63%	16%	28%	11%	-
Tillet	8%	46%	11%	68%	50%	100%
Terre Nue	27%	2%	100%	100%	100%	-
Hyères	7%	7%	21%	3%	0%	100%
Albanne	0%	16%	25%	67%	66%	5%
Leyse	7%	28%	20%	38%	25%	1%
Plage	3%	31%	11%	27%	25%	100%
Savières	23%	1%	8%	52%	0%	-
Nb SA~SN	1		1		-	
Nb SA<SN	6		7		4/6 observations	

Les biofilms développés sur les substrats naturels présentent des concentrations significativement supérieures en flagellés (nombre de cas où $S.Nat.>S.Art./$ nombre d'observations : 18/27 ; Figure 51, Tableau 38 et Tableau 42A).

On observe tout de même quelques exceptions, principalement durant la dernière campagne. Il n'y a pas de différence significative aux stations Sierroz, Terre Nue et Savières en mai 2008, ni aux stations Sierroz, Terre Nue et Leyse en octobre 2008. En mai 2009, des flagellés sont présents aux stations Aquarium, Terre Nue et Savières dans les biofilms des substrats artificiels mais pas dans ceux échantillonnés sur les substrats naturels. La différence n'est pas non plus significative dans les stations Tillet et Plage.

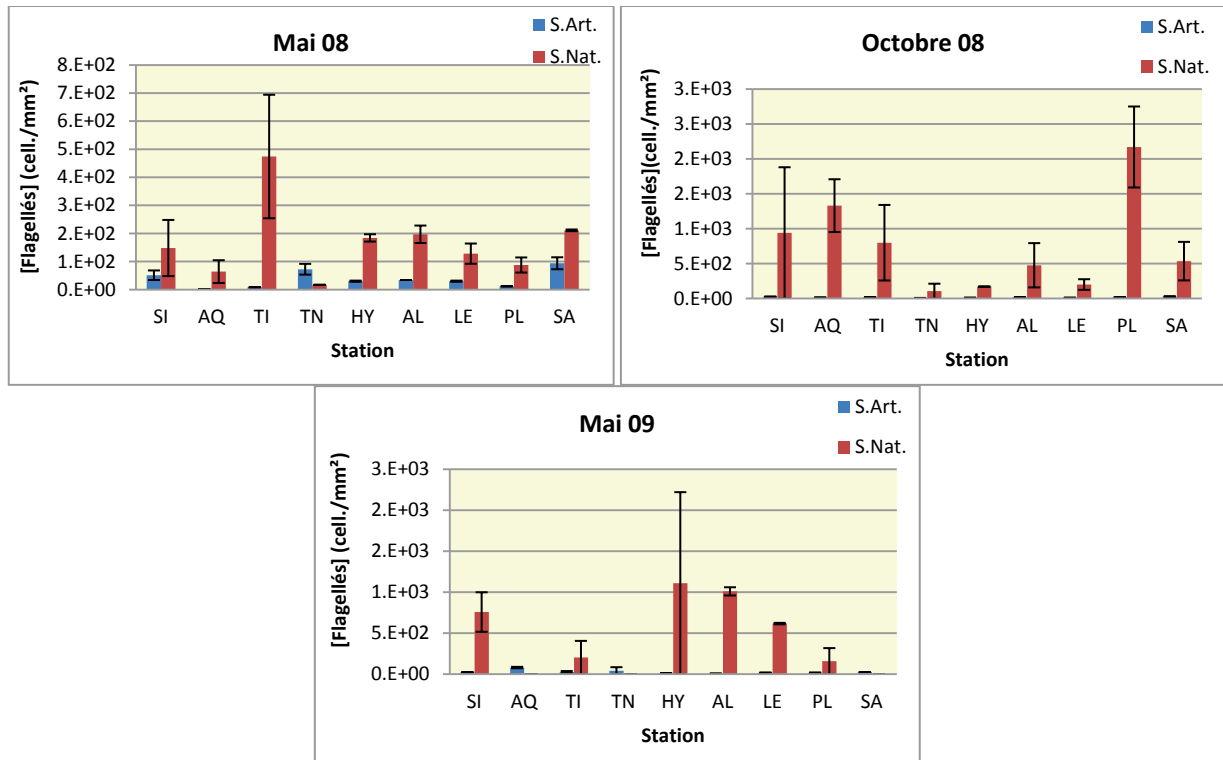


Figure 51: Comparaison de la concentration en flagellés en fonction du type de substrat.

Codes des substrats : S.Art. : substrat artificiel ; S.Nat. : substrat naturel;

Codes des stations : SI : Sierroz, AQ : Aquarium, TI : Tillet, TN : Terre Nue, HY : Hyères, AL : Albanne, LE : Leyse, PL : Plage, SA : Savières.

Tableau 42: Comparaison de la concentration de flagellés (p-values ; test de Mann Whitney)

A : en fonction du type de substrat pour chaque station et chaque campagne ;

B : entre les 2 campagnes effectuées en mai pour chaque station et par type de substrat).

La différence est significative pour $p < 0.05$ (valeur en rouge et en gras).

STATION	A- Comparaison S.Art./S.Nat.			B- Comparaison des campagnes mai 08/mai 09	
	mai-08	oct-08	mai-09	S.Art.	S.Nat.
SIERROZ	0.2752	0.5127	0.0495	0.0495	0.0495
AQUARIUM	0.0495	0.0495	0.0495	0.0495	0.0495
TILLET	0.0495	0.0495	0.5127	0.0495	0.2752
TERRE NUE	0.5127	0.3827	0.1904	0.5127	0.0495
HYERES	0.0495	0.0495	0.3827	0.0495	0.5127
ALBANNE	0.0495	0.0495	0.0495	0.0495	0.0495
LEYSSE	0.0495	0.5127	0.0495	0.5127	0.0495
PLAGE	0.0495	0.0495	0.5127	0.1266	0.5127
SAVIERES	0.2752	0.0495	0.5127	0.0495	0.5127

L'utilisation des substrats artificiels ne permet pas d'améliorer la stabilité de la concentration des flagellés d'une année sur l'autre (Figure 52 et Tableau 42B). En effet, la différence n'est pas significative seulement pour 3 stations (Terre Nue, Leyse et Plage) pour les substrats artificiels et pour 4 stations (Tillet, Hyères, Plage et Savières) pour les substrats naturels.

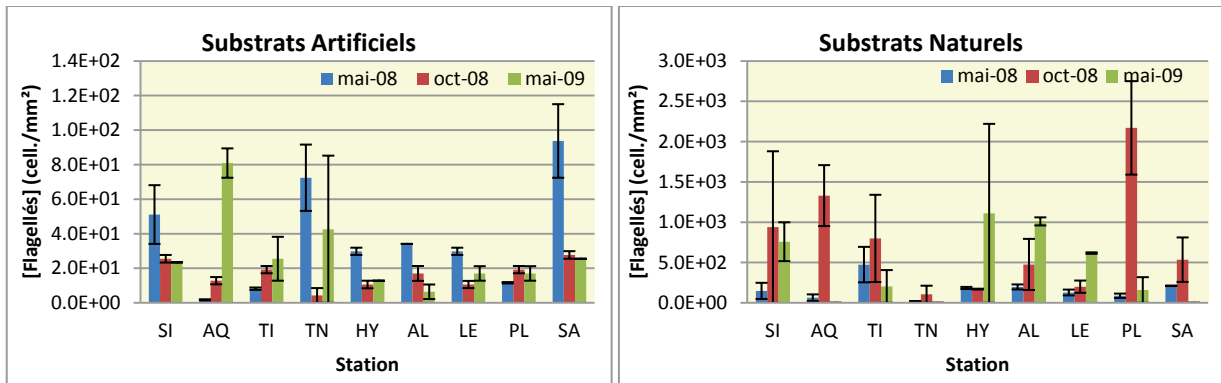


Figure 52 : Comparaison de la concentration en flagellés par type de substrat.
Codes des stations : SI : Sierroz, AQ : Aquarium, TI : Tillet, TN : Terre Nue, HY : Hyères, AL : Albanne, LE : Laysse, PL : Plage, SA : Savières.

Les flagellés autotrophes sont assez rares dans nos biofilms (Tableau 43), ils sont même absents dans tous les biofilms prélevés sur les substrats naturels. Dans le cas des biofilms développés sur lames de verre, ils sont absents pour toutes les stations lors de la campagne du mois de mai 2009.

Tableau 43: Comparaison de la concentration de flagellés autotrophes en fonction du type de substrat (p-values ; test de Mann Whitney).

La différence est significative pour $p < 0.05$ (valeur en rouge et en gras).

Campagne	Station	Concentrations de flagellés autotrophes		
		S.Art. (cell./mm ²)	S.Nat. (cell./mm ²)	p value
mai-08	Tillet	1.36	0	0.8273
	Terre Nue	2.13	0	0.1904
	Plage	2.04	0	0.0495
	Savières	6.39	0	0.1904
oct-08	Sierroz	2.13	0	0.1904

Les concentrations des flagellés autotrophes sont très hétérogènes entre les triplicats, principalement en raison de leur rareté. Le CV_{MAD} est, en effet, de 50% à la station Plage (Mai 08, substrats artificiels), et de 100% dans les autres cas.

Lorsqu'ils sont présents, les flagellés autotrophes représentent entre 4 et 18% des flagellés totaux. Du fait de la faible concentration des flagellés autotrophes, les concentrations en flagellés hétérotrophes sont donc très proches de celles des flagellés totaux et ne sont pas présentées ici.

L'utilisation des substrats artificiels engendre une baisse de concentrations des flagellés et des amibes par rapport à l'utilisation des substrats naturels. Par contre, seuls les substrats artificiels permettent le dénombrement de groupes plus rares tels que les ciliés ou les flagellés autotrophes. L'absence de flagellés autotrophes sur les substrats naturels mais pas sur les substrats artificiels peut refléter une modification de la communauté des flagellés du biofilm.

Les substrats artificiels permettent de diminuer la variabilité inter-répliat des concentrations d'amibes et de flagellés. Mais ils augmentent la variabilité inter-annuelle de la concentration des amibes.

4.5 Influence de la technique d'échantillonnage des biofilms

Les paragraphes précédents ont montré que l'utilisation de l'une ou l'autre de ces techniques d'échantillonnage a un impact sur de nombreux descripteurs du biofilm ainsi que sur leur variabilité inter-réplicat ou inter-annuelle des descripteurs.

Les descripteurs étudiés précédemment peuvent être regroupés en 3 catégories : ceux qui ne sont pas influencés par la nature du substrat (différence non significative); les descripteurs présentant une forte baisse lors de l'utilisation des substrats artificiels et enfin ceux qui sont uniquement présent sur les substrats artificiels (Tableau 44).

Tableau 44 : Classement des descripteurs en fonction de l'influence de la nature du substrat

Descripteurs du même ordre de grandeur quelque soit le type de substrat	Descripteurs présents uniquement sur les substrats artificiels	Descripteurs inférieurs sur les substrats artificiels
% matière organique (variable selon les stations) % Bactéries _{cultivables} $Lpn_{\text{totales}} / \text{Bactéries}_{\text{totales}}$ (sauf octobre 08) $Lpn_{\text{FISH}} / \text{Bactéries}_{\text{totales}}$ (sauf mai 08) $Lpn_{\text{FISH}} / Lpn_{\text{totales}}$ (mai 08) Bactéries _{cultivables} (octobre 08)	Ciliés Flagellés autotrophes	Poids sec Matière organique Bactéries _{totales} Bactéries _{cultivables} (sauf octobre 08) Lpn_{totales} Lpn_{FISH} $Lpn_{\text{cultivables}}^*$ Flagellés Amibes $Lpn_{\text{totales}} / \text{Bactéries}_{\text{totales}}$ (octobre 08) $Lpn_{\text{FISH}} / \text{Bactéries}_{\text{totales}}$ (sauf mai 08) $Lpn_{\text{FISH}} / Lpn_{\text{totales}}$ (sauf mai 08)

Il est possible de remarquer que les descripteurs « simples » (concentrations de chaque groupe de microorganismes) présentent généralement des différences très marquées selon la nature du substrat. Ces différences vont généralement dans le sens de concentrations inférieures sur les substrats artificiels. Seuls les ciliés et les flagellés autotrophes font exception avec une présence uniquement sur les substrats artificiels même si leur présence reste rare.

Une attention particulière doit être portée à la concentration de la forme cultivable de Lpn (*) qui est rencontrée dans un plus grand nombre d'échantillons sur les substrats artificiels. Mais lorsque cette forme est également présente dans les biofilms des substrats naturels, leur concentration y est significativement supérieure.

A l'inverse, lorsque l'on s'intéresse aux rapports entre ces descripteurs « simples », ils ne paraissent pas influencés par la nature du substrat. Seules les proportions des différentes formes de $Lpn_{\text{cultivables}}$ peuvent faire exception pour une ou plusieurs campagnes. Dans ce cas-là, ces rapports sont significativement supérieurs dans les biofilms des substrats naturels, comme c'était aussi le cas avec leurs concentrations.

La technique d'échantillonnage peut également avoir un impact important sur la stabilité à long terme des biofilms (Tableau 45), c'est-à-dire sur les variations des descripteurs observables d'une année sur l'autre pour une même période. L'utilisation des substrats artificiels a donc une influence variable en fonction du descripteur considéré. Tous les cas de figures sont présents ici.

Tableau 45: Classement des descripteurs en fonction de l'effet du substrat sur leur variabilité inter-annuelle.

Descripteurs plus stables sur les substrats artificiels	Descripteurs moins stables sur les substrats artificiels	Variabilité inter-annuelle équivalente
$\% \text{ bactéries}_{\text{cultivables}}$ $Lpn_{\text{totales}} / \text{Bactéries}_{\text{totales}}$ Lpn_{FISH}	Matière organique $\% \text{ matière organique}$ $\text{Bactéries}_{\text{totales}}$ Amibes $Lpn_{\text{FISH}} / \text{Bactéries}_{\text{totales}}$	$\text{Bactéries}_{\text{cultivables}}$ Poids sec Flagellés Lpn_{totales} $Lpn_{\text{FISH}} / Lpn_{\text{totales}}$

Le troisième effet potentiel du substrat recherché ici concerne la variabilité inter-réplicats des différents descripteurs (Tableau 46). On remarque que cet effet varie très souvent en fonction des campagnes ou des stations. Mais l'utilisation des substrats artificiels confère une meilleure homogénéité pour différents descripteurs.

Tableau 46 : Classement des descripteurs en fonction de l'effet du substrat sur la variabilité (MAD/Médiane) inter-réplicats.

Descripteurs plus homogènes sur les substrats artificiels	Descripteurs plus homogènes sur les substrats naturels	Descripteurs avec une évolution de l'homogénéité variable selon les observations
Poids sec Matière organique $\% \text{ matière organique}$ Bactéries totales $\% \text{ bactéries cultivables}$ (mai 08) Lpn_{totales} (mai 08) $\% Lpn_{\text{FISH}} / \text{Bactéries}_{\text{totales}}$ (sauf mai 09) Amibes (mai 08) Flagellés	$\% \text{ Bactéries cultivables}$ (mai 09)	Bactéries cultivables $\% \text{ Bactéries cultivables}$ (octobre 08) Lpn_{totales} (oct. 08 ; mai 09) $\% Lpn_{\text{totales}} / \text{Bactéries}_{\text{totales}}$ Lpn_{FISH} $\% Lpn_{\text{FISH}} / \text{Bactéries}_{\text{totales}}$ (mai 09) $Lpn_{\text{FISH}} / Lpn_{\text{totales}}$ Amibes (oct. 08 ; mai 09)

4.6 Conclusions concernant l'importance de la technique d'échantillonnage des biofilms

Il existe donc bien une différence marquée entre les biofilms en fonction de la technique d'échantillonnage : ceux développés sur les substrats artificiels ne sont donc pas bien représentatifs des biofilms naturels en termes de concentrations en micro-organismes, mais ils restent représentatifs des biofilms naturels lorsque l'on considère les rapports entre ces descripteurs. C'est le cas pour les proportions des différentes formes de *Lpn*, et plus particulièrement pour la proportion des *Lpn*_{totales} lors des campagnes effectuées en mai.

De plus, la « surestimation » des formes cultivables de *Lpn*, à travers une présence plus fréquente sur les substrats artificiels donne à l'utilisation de ces substrats un intérêt tout particulier dans une étude visant à prendre la mesure, même indirectement, de "l'activité de *Legionella pneumophila*" dans l'environnement.

Les biofilms échantillonnés sur les substrats naturels représentent donc plus un historique à long terme de l'occurrence de *Lpn* dans les cours d'eau. Tandis que l'utilisation des substrats artificiels peut permettre de visualiser plus rapidement une augmentation de la concentration de *Lpn*_{cultivables} que les substrats naturels.

Même si certains auteurs considèrent que 14 jours de développement peuvent conduire à l'obtention d'un biofilm mature (Hunt & Parry, 1998, Stoodley, *et al.*, 1999, Lear, *et al.*, 2008), nos résultats sont plus réservés. Une incubation de 15 jours suffit en effet, si l'on considère les proportions des différents groupes d'organismes dans le biofilm, mais pas si l'on considère uniquement leurs concentrations.

On observe, sur les substrats naturels une concentration bactérienne comprise entre 3×10^6 à 6.5×10^7 bact/cm² et une concentration de protistes variant entre 1.65×10^4 à 7.32×10^5 cellule/cm². Ces valeurs sont en accord avec les données bibliographiques concernant les biofilms matures : les concentrations bactériennes sont comprises entre 5×10^6 à 15×10^7 bact/cm² (Lazar, Hunt & Parry, 1998, Stoodley, *et al.*, 2001, Pohlen, *et al.*, 2010) alors que les concentrations des protistes sont supérieures à 10^2 cellule/cm² et peuvent même dépasser 10^6 cellule/cm². Les biofilms des substrats artificiels contiennent seulement entre 2×10^5 et 3×10^6 bactéries/cm² ; et entre 200 et 1×10^4 protistes/cm².

Cette observation nous confirme que les biofilms des substrats artificiels n'ont pas complètement atteint leur stade mature après 15 jours de développement en rivière, surtout si l'on s'intéresse à la communauté bactérienne.

La présence d'organismes présents uniquement sur les substrats artificiels (ciliés et flagellés autotrophes) suggère une succession des différents groupes de protistes au cours du développement du biofilm. Les formes autotrophes étant principalement présentes dans les formes jeunes des biofilms disparaissent ensuite des biofilms matures. Il a d'ailleurs déjà été montré que la communauté de protistes des biofilms se modifie suite aux changements de composition de leurs proies et que les ciliés pouvaient être absents dans les biofilms naturels prélevés sur des galets (Hunt & Parry, 1998, Wey, *et al.*, 2008).

Nous avons également montré dans ce chapitre que l'utilisation de substrats artificiels peut permettre, selon les descripteurs, de diminuer la variabilité observée entre les réplicats. Les biofilms des substrats naturels de cours d'eau sont en effet reconnus comme étant plus hétérogènes entre différentes zones d'un même substrat qu'entre différents points d'une section de cours d'eau (Lear, *et al.*, 2008).

Les substrats artificiels présentent deux avantages principaux :

- une durée de développement connue et définie par l'utilisateur en fonction de ses objectifs et de ses contraintes (changements de régime hydrographique...).
- une surface bien définie : à l'inverse, la surface des substrats naturels est plus ou moins poreuse selon leur nature. La porosité multiplie alors la surface sur laquelle se développe le biofilm, conduisant à une sous-estimation de la surface réelle et, par conséquent, à une surestimation des concentrations des différents composants du biofilm par unité de surface.

La porosité des substrats naturels, n'a pas pu être estimée sur nos échantillons, mais elle ne semble pas expliquer la différence de concentrations observée entre les deux techniques d'échantillonnage. Dans ce cas-là, les concentrations obtenues sur les substrats naturels seraient supérieures aux données bibliographiques. Or, comme nous l'avons montré précédemment, ce n'est pas le cas ici.

Malgré l'existence des différences dans la structure des biofilms selon la nature du substrat, ces résultats nous permettent tout de même de valider l'utilisation des substrats artificiels dans le cadre de notre étude. Certaines caractéristiques des biofilms obtenus sur les substrats artificiels, comme une communauté bactérienne plus cultivable ou une disparition des flagellés autotrophes, qui semblent être caractéristiques de biofilms encore jeunes (Wey, *et al.*, 2008), doivent tout de même être gardés en mémoire pour la suite de nos résultats.

***5 - Distribution de
L. pneumophila dans les
biofilms des affluents du Lac
du Bourget : analyse des
facteurs de contrôle
potentiels***

Les résultats présentés dans ce chapitre viennent répondre à l'objectif que nous nous étions fixé d'établir un inventaire de *Lpn* dans les biofilms des principaux affluents du lac du Bourget sur la base d'une période d'observation de 2 ans. Cet inventaire avait deux buts, celui d'évaluer le degré de présence de *Lpn* dans les affluents et, de ce fait, de comparer les sous-bassins du lac qui leur correspondent en tant que sources potentielles. Chaque affluent représentant un contexte environnemental particulier, leur comparaison devait également apporter une contribution à l'identification des conditions environnementales favorables ou non au développement des *Lpn* dans les biofilms.

Nous avons fait l'hypothèse que les facteurs physiques sont les premières variables explicatives des descripteurs biologiques. Il convenait donc, dans un premier temps, d'identifier la structure de la matrice de données physiques et, s'agissant de cours d'eau, notamment du point de vue hydrodynamique, avant de confronter ces données aux caractéristiques des communautés microbiennes.

5.1 Variations des débits des cours d'eau durant la phase de développement des biofilms

Les conditions physico-chimiques dans lesquelles se développent les biofilms conditionnent à la fois leur structure physique, mais également la diversité des communautés microbiennes. Ainsi d'importantes forces de cisaillement se traduisent par la formation d'un biofilm moins épais mais plus dense, d'une diversité bactérienne inférieure et d'une maturation plus lente (Kwok, *et al.*, 1998, Rochex, *et al.*, 2008).

Peu d'études s'intéressent à l'effet des variations de débit au cours du développement des biofilms. Ces variations peuvent être considérées à travers deux composantes : les forces de cisaillement en tant que facteur d'érosion du biofilm et le flux des éléments nutritifs dans l'eau libre qui peut avoir une incidence sur les flux d'apports au biofilm et donc aux cellules qu'il contient. Nous essayons, dans ce chapitre d'identifier ces deux aspects dans le cas des biofilms des affluents du lac du Bourget.

L'augmentation du débit s'accompagne d'une augmentation de la vitesse de l'eau, qui se traduit par une augmentation des forces de cisaillement au contact des surfaces immergées. L'épaisseur des biofilms est à tout moment la résultante entre leur croissance (multiplication des cellules et production d'EPS) et l'importance des processus de détachement en partie liés aux forces de cisaillement (Hunt, *et al.*, 2004). Nous n'avons pas fait de mesure directe des forces de cisaillement. Leur effet sera cependant envisagé dans l'interprétation des conséquences des variations de débit.

Choix des descripteurs physiques à mettre en regard avec les caractéristiques des biofilms.

Deux périodes ont été prises en compte pour l'analyse des variations des descripteurs physiques susceptibles d'avoir un impact sur le développement des biofilms et donc, à terme, sur leurs caractéristiques (poids sec, fraction organique, concentrations en bactéries _{totales}). Pour chacune d'entre elles, les analyses ont été basées sur le recensement des "événements hydrodynamiques" (intensité et fréquence des variations du débit moyen journalier, ΔQ). La première est la période de colonisation des lames de verre durant laquelle la situation dans le temps de ces événements a également été prise en compte : on peut supposer en effet qu'une augmentation de débit lors de la deuxième semaine d'incubation a eu un impact plus important en termes d'érosion du biofilm que si elle s'est produite au cours de la première semaine.

La deuxième période prise en compte est celle de la pré-incubation. Elle concerne les 15 jours qui précèdent le dépôt des lames dans les cours d'eau. Nous avons retenu cette durée à la suite d'une analyse de la relation pluie-débit sur la base des moyennes mobiles. Nous avons fait l'hypothèse d'une incidence indirecte de cette période sur le développement des biofilms durant la période d'incubation, par le biais de la composition de l'eau. En effet, des augmentations de débits consécutives à des épisodes pluvieux, peuvent avoir été des indicateurs d'apports d'ions issus du bassin versant ou, à l'inverse, de phases de dilution des ions présents dans les rivières, toutes modifications dont les incidences sur la composition de l'eau peuvent subsister au moins en partie durant la période d'incubation des biofilms. Ces événements orageux peuvent également avoir remis en suspensions une quantité importante de particules qui ont alors augmenté le pouvoir abrasif de l'eau ou qui se sont déposées sur et entre les supports, participant ainsi à l'augmentation de la fraction inerte des biofilms et à la perturbation des échanges entre l'eau libre et les microorganismes fixés.

La matrice de données analysée présente des points particuliers :

Le temps nécessaire au traitement des échantillons lors de la récupération des substrats artificiels nous a contraints à étaler la récupération des échantillons sur deux journées, d'où le classement des stations dans deux groupes (le groupe des stations situées au nord et à l'est du lac et le groupe des stations situées au sud du lac). Pour donner le même âge aux biofilms, la mise en place des lames a, en correspondance, été effectuée avec un décalage. Au cours de certaines campagnes, des échantillons ont disparu pendant l'incubation (problèmes d'érosion des cordelettes, actes de vandalismes...). Dès que leur perte a été constatée, ces échantillons ont immédiatement été remplacés. Pour l'ensemble des cas, le décalage entre les stations concernées et le relevé normal a été compris entre quelques jours et 15 jours (Tableau 4).

Certaines stations n'ont pas été incluses dans l'étude des débits. C'est le cas de la station Plage, située dans le lac lui-même et de la station située sur le ruisseau de Terre Nue pour lequel aucun enregistrement n'est effectué par les différents services s'intéressant au suivi des cours d'eau. Ce canal présente une vitesse inférieure à 0.01 m/s au niveau de la veine centrale. Son débit reste donc toujours très faible. Dans nos analyses factorielles, nous considérerons une valeur de débit nulle pour ces deux stations.

Les données de la station Albanne sont manquantes au cours des deux premières campagnes probablement en raison d'une panne de l'enregistreur, ou de son arrêt lors des travaux d'aménagement de la confluence entre l'Albanne et la Lysse.

5.2 Caractéristiques des campagnes de prélèvement du point de vue des événements hydrologiques

L'hydrodynamisme des cours d'eau est étudié ici à travers la valeur médiane du débit moyen journalier pour les deux périodes précédemment définies (pré-incubation et incubation). Pour chaque campagne, nous commencerons la description des débits en traitant le cas de la période d'incubation en raison de son effet plus direct sur les biofilms. L'instabilité hydraulique des différentes périodes est estimée par les calculs du MAD, du rapport MAD/médiane, (ou CV_{MAD} , exprimé en %), du nombre de pics présents ainsi que de leur durée et du moment de leur apparition au cours du développement des biofilms.

5.2.1 Août 2007

Dès la première campagne, en août 2007 (Figure 53, Figure 54), certaines particularités des enregistrements sont visibles. Tout d'abord, la durée d'incubation au niveau de la station Tillet est exceptionnellement de 16 jours au lieu de 15, car au quinzième jour, les échantillons se sont retrouvés piégés dans la grille située au niveau de la bifurcation en direction de la Chaudanne et n'ont pu être récupérés que le lendemain de la date prévue. Au cours de cette campagne, les échantillons de la station Aquarium ont été perdus, de nouveaux échantillons ont donc été déposés avec un retard de 15 jours.

Concernant l'hydrodynamique, on remarque tout d'abord que la station Savières se comporte différemment des autres stations, avec une très forte variabilité (80% au cours de la pré-incubation et 39% lors de l'incubation) et avec une valeur de débit négative pour certaines dates. Comme cela a été précisé précédemment, l'exutoire du lac vers le Rhône est régulé grâce à un barrage au niveau de la confluence avec ce dernier. En situation normale, le lac se déverse dans le Rhône, mais dans certaines conditions, le lac peut servir d'exutoire au Rhône ce qui peut expliquer les valeurs négatives enregistrées. Une autre hypothèse concerne le calcul des débits à partir de l'équation issue de la courbe de tarage dans le cas de très faibles débits. Leur valeur absolue reste faible, ce qui nous pousse à considérer ces débits comme nuls. Enfin, une dernière hypothèse, est celle d'une panne au niveau du limnigraphe géré par la Compagnie Nationale du Rhône.

On remarque également que le débit au niveau de la station Aquarium est paradoxalement très inférieur à celui des autres stations, et que ses variations sont moins marquées (5% pour la période de pré-incubation et 2% pour l'incubation).

Sur les autres stations, c'est-à-dire Sierroz, Tillet, Leysse et Hyères (Figure 54), nous observons un comportement similaire des débits. Le décalage entre les courbes provient des 2 jours de décalage lors du dépôt des lames.

La station Leysse présente des débits supérieurs ($2.53 \text{ m}^3/\text{s}$) à ceux des autres stations. Les débits sont équivalents pour les stations Hyères et Sierroz (0.62 et $0.79 \text{ m}^3/\text{s}$ respectivement). Le Tillet présente les débits les plus faibles ($0.21 \text{ m}^3/\text{s}$). Les coefficients de variation de la Leysse et de son affluent l'Hyères sont un peu plus élevés (Figure 28).

Pour toutes ces stations, on observe la présence d'un ou deux pics de débit au cours de l'incubation (Figure 54). Le premier a lieu au cinquième ou au septième jour, tandis que le second apparaît lors des derniers jours de l'incubation (entre le treizième et le dernier jour). Cette deuxième augmentation est plus importante que la première en terme d'amplitude (variation de débit, ou ΔQ , compris entre 330 et 547% du débit à la veille du pic pour le deuxième pic, contre 220 et 497% pour le premier pic), seul le Sierroz fait exception avec un ΔQ de 175% pour le premier pic et de 90% pour le second. Ce deuxième pic est plus important que le premier pour l'évolution des biofilms du fait de sa situation en toute fin d'incubation. En effet, s'il suffit à engendrer un décrochage de fragments du biofilm, il pourrait expliquer des valeurs inférieures de certains descripteurs du biofilm.

La période de pré-incubation présente également 2 ou 3 pics de débits. A la station Savières, l'augmentation du débit a lieu entre les jours -13 et -4, avec un ralentissement entre les jours -6 et -7, le débit passe ainsi d'une valeur quasi nulle à $13 \text{ m}^3/\text{s}$, soit une augmentation de 4859%. La station Aquarium ne présente pas de pic à proprement parler, mais son débit augmente entre les jours -12 et -8 avec un ΔQ sur cette période de 20% seulement.

Pour les autres stations le pic le plus éloigné du dépôt des lames est observé au jour -12 sur le Sierroz et le Tillet ou au jour -14 sur la Leysse ainsi que son affluent l'Hyères. L'amplitude de ce pic (38 à 107%) est très inférieure à celle du suivant qui s'observe autour du cinquième jour avant l'incubation sur le Sierroz et le Tillet ou du 7^{ème} jour sur la Leysse ainsi que sur l'Hyères (307 à 1217%). Ces deux dernières stations présentent également une légère augmentation de leur débit (~30%) 3 jours avant le dépôt des lames. Au niveau des stations Sierroz et Tillet, un troisième pic n'est pas visible, mais on observe un plateau au cours de la décroissance du débit qui suit le deuxième pic.

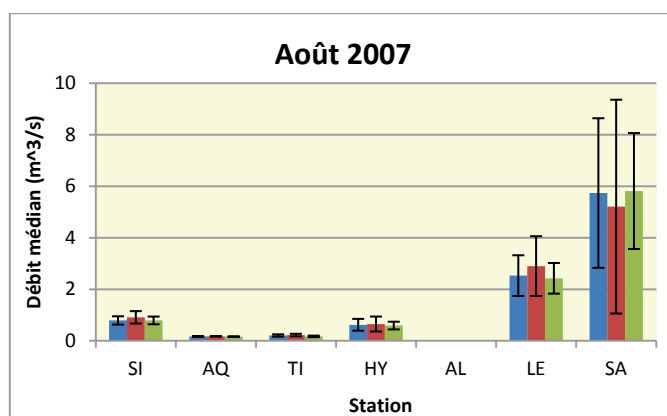


Figure 53: Débit médian pour la période complète (bleu), pour la période de pré-incubation (rouge) et pour la période d'incubation (vert).

Tableau 47: Débit médian et coefficient de variation (MAD/Médiane) par station et par période (août 2007).

Station	CV _{MAD} période (%)	CV _{MAD} pré-incubation (%)	CV _{MAD} incubation (%)
Sierroz	20	26	19
Aquarium	5	5	2
Tillet	22	23	18
Hyères	37	45	25
Albanne	-	-	-
Leyse	31	40	24
Savières	51	80	39

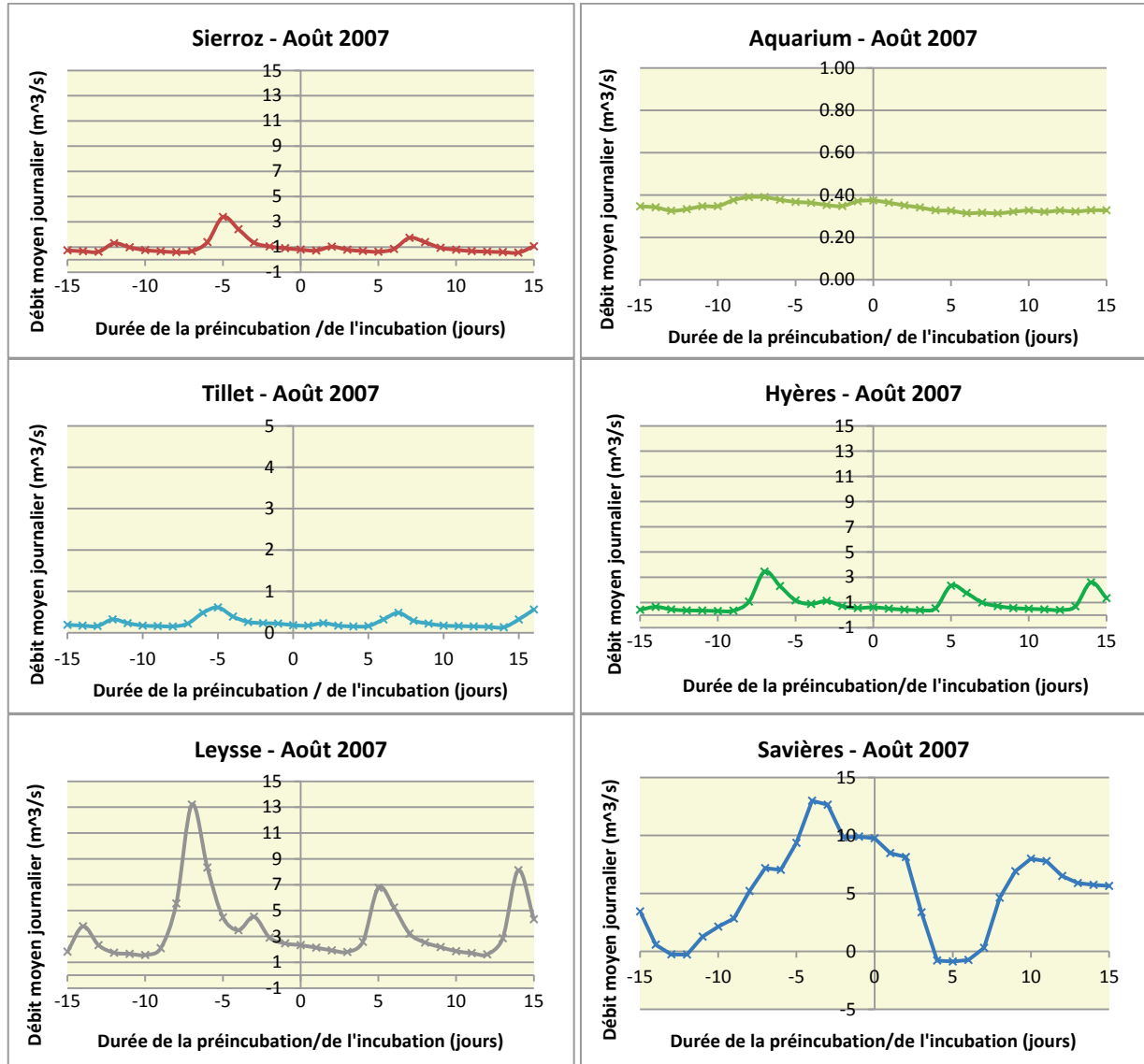


Figure 54: Suivi des débits lors de la campagne d'août 2007.

5.2.2 Octobre 2007

Au cours de la deuxième campagne, la valeur médiane des débits moyens journaliers augmente par rapport à la première campagne uniquement pour la station Savières (Figure 55). Seule cette station présente également une différence significative de son débit moyen journalier entre la période de pré-incubation et la période d'incubation. A l'exception de la station Aquarium, la dispersion autour du débit médian au cours de cette campagne est du même ordre de grandeur qu'en août 2007 (Tableau 48). Au niveau de la station Aquarium, une augmentation du débit se maintient pendant les premiers jours de l'incubation et semble correspondre aux pics qui sont observés à la fin de la période de pré-incubation dans les autres stations. Le décalage dans la mise en place des lames est d'un jour seulement entre les deux groupes de stations (Figure 56).

Le classement des autres stations en fonction de leur débit reste le même que pour la première campagne. Une petite augmentation de débit est observée entre le quatrième et le cinquième jour. Cette augmentation est deux fois moins importante que celle observée au cours de la première campagne, elle représente en effet un ΔQ compris entre 25 et 82%. Au cours de cette campagne, seules les données correspondant à la dernière semaine d'incubation des biofilms sont disponibles pour la station Hyères.

Sur l'ensemble des stations pour lesquelles on dispose des données concernant la période de pré-incubation, on observe une première augmentation brusque des débits entre les jours -14 et -12 sur le canal de Savières ($\Delta Q=4603\%$); entre les jours -14 et -13 sur le Sierroz ($\Delta Q=779\%$), à l'Aquarium ($\Delta Q=23\%$) et sur le Tillet ($\Delta Q=410\%$) et lors du premier jour de la période de pré-incubation sur la Leyse ($\Delta Q=430\%$). Sur le canal de Savières, le débit augmente ensuite progressivement à partir du dixième jour précédant l'incubation et se poursuit lors des premiers jours de développement du biofilm ($\Delta Q=78\%$ jusqu'à la pose des lames). A la station Aquarium, l'augmentation progressive du débit que l'on observe également lors des premiers jours d'incubation débute quatre jours avant la mise en place des lames ($\Delta Q=39\%$). Le Tillet et la Leyse présentent une légère augmentation autour du jour -6 et -7 respectivement ($\Delta Q=63\%$ et 98%), puis une autre aux jours -3 et -4 ($\Delta Q=71\%$ et 985%), et enfin une dernière au jour -2 ou -1 ($\Delta Q=2\%$ sur la Leyse et 148% sur le Tillet).

Tableau 48: Coefficient de variation des débits par station et par période (octobre 2007).

Station	CV _{MAD} période (%)	CV _{MAD} pré-incubation (%)	CV _{MAD} incubation (%)
Sierroz	36	38	24
Aquarium	14	5	39
Tillet	22	21	21
Hyères	19	-	19
Albanne	-	-	-
Leyse	38	50	30
Savières	44	21	20

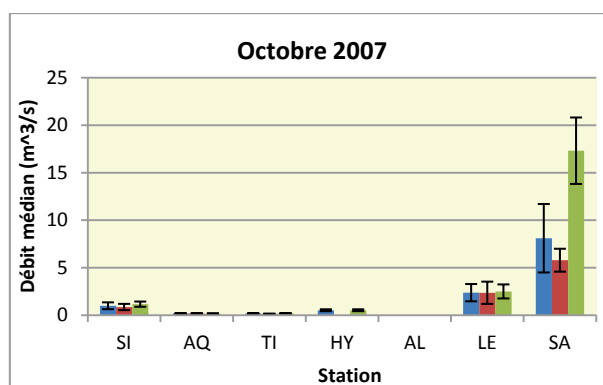


Figure 55 : débit médian pour la période complète (bleu), pour la période de pré-incubation (rouge), pour la période d'incubation (vert).

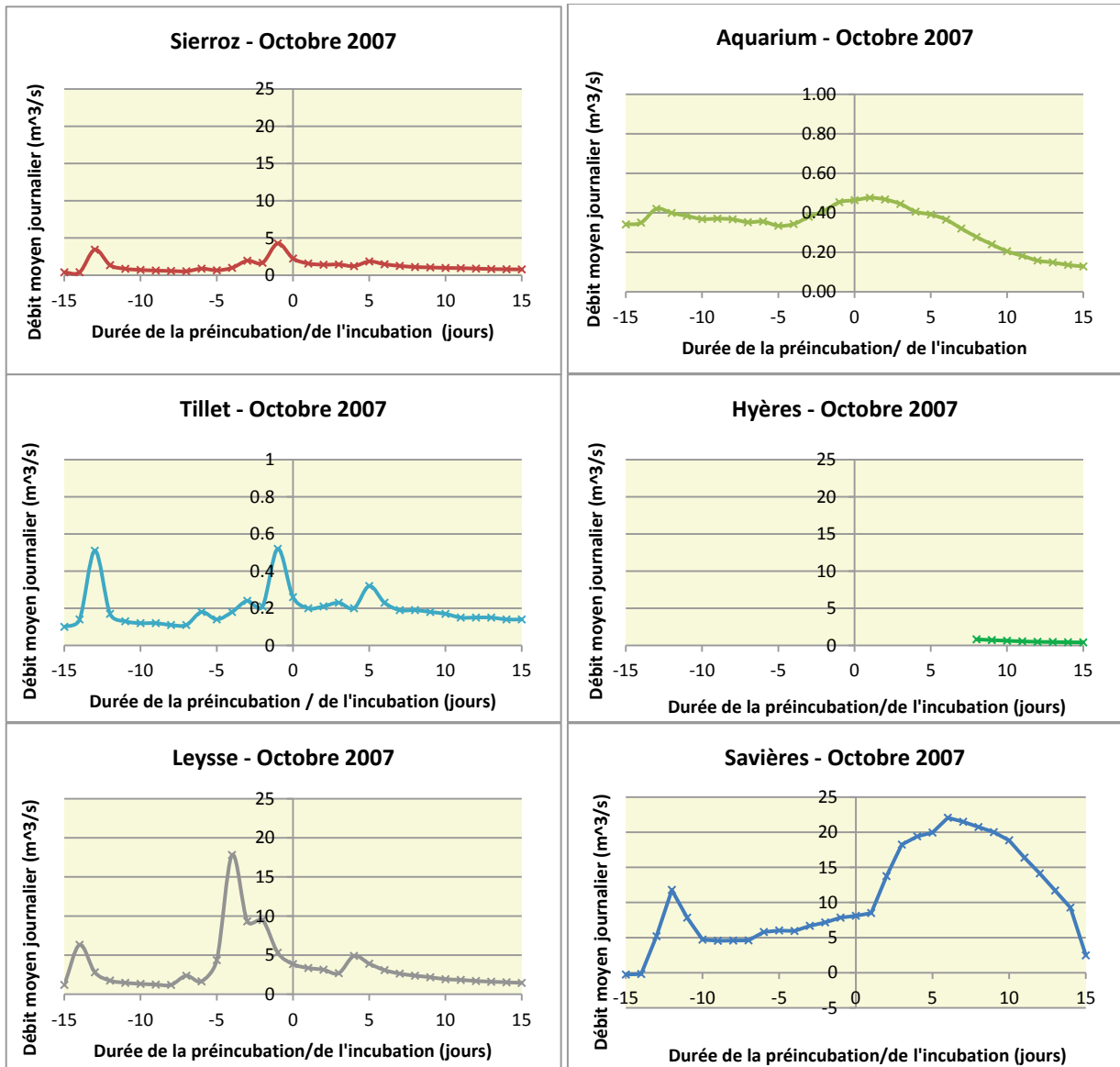


Figure 56: suivi des débits lors de la campagne d'octobre 2007.

5.2.3 Janvier 2008

En janvier 2008, les stations Savières et Aquarium présentent une fois encore un comportement particulier (Figure 58). Mais comme pour la première campagne, une nouvelle perte des échantillons à la station Aquarium a retardé de 15 jours la période d'incubation. Pour les autres stations, le décalage lors du dépôt des lames entre les deux groupes de stations est de 2 jours.

On remarque que d'une manière générale, la station Tillet présente des variations plus importantes que les autres stations pendant la période de développement des biofilms ($CV_{MAD} = 33\%$) tandis que le canal de Savières est le plus stable pour cette même période ($CV_{MAD} = 7\%$) (Tableau 49).

Le débit du Canal de Savières augmente légèrement et régulièrement tout au long de l'incubation des lames (compris entre 0.5 et 11%). A l'inverse, celui de la station Aquarium a tendance à diminuer tout au long de cette période (Figure 58).

Les autres stations présentent 2 ou 3 pics de débits, en fonction du groupe auquel elles appartiennent lors du dépôt des lames. Les stations Sierroz et Tillet présentent donc 2 pics dont la valeur maximale est observée au cinquième et neuvième jour (ΔQ allant de 99 à 184%). On observe également un début d'augmentation du débit pour le dernier jour de l'incubation ($\Delta Q = 14\%$ sur le Sierroz et 42% sur le Tillet). Les stations Leyse, Hyères et Albanne présentent les mêmes augmentations de débits mais aux jours 3 et 7 (ΔQ allant de 51 à 264%), ainsi qu'une nouvelle augmentation mais de plus faible amplitude au treizième jour d'incubation (ΔQ compris entre 40 et 61%).

On peut enfin remarquer, comme on pouvait s'y attendre, que la plus grande partie des débits mesurés sur la partie aval de la Leyse proviennent de l'ensemble Leyse+Albanne (station Albanne) par rapport à l'Hyères.

Pour l'ensemble des stations, on remarque que le débit médian au cours de la période de pré-incubation est inférieur à celui de l'incubation (Figure 57). En effet, la période qui précède l'incubation est caractérisée sur le Sierroz, le Tillet, la Leyse, l'Hyères et l'Albanne par une certaine stabilité des débits, qui s'achève un à deux jours avant la mise en place des lames. L'augmentation des débits est alors marquée avec un ΔQ variant de 433% pour le Tillet à 3431% pour l'Albanne. Sur le canal de Savières, le débit augmente 10 jours avant le début de l'incubation ($\Delta Q = 44\%$). On observe une chute importante des débits 5 jours, puis une brusque remontée 2 jours avant le dépôt ($\Delta Q = 9541\%$). Au niveau de la station Aquarium, le débit augmente 7 jours avant le début de l'incubation, puis il se stabilise jusqu'à la mise en place des lames ($\Delta Q_{\text{journalier}}$ compris entre 0.2 et 32%).

Tableau 49 : Coefficient de variation des débits par station et par période (janvier 2008).

Station	CV _{MAD} période (%)	CV _{MAD} pré-incubation (%)	CV _{MAD} incubation (%)
Sierroz	64	13	27
Aquarium	23	14	14
Tillet	48	7	33
Hyères	62	14	24
Albanne	80	6	25
Leyse	61	13	21
Savières	24	11	7

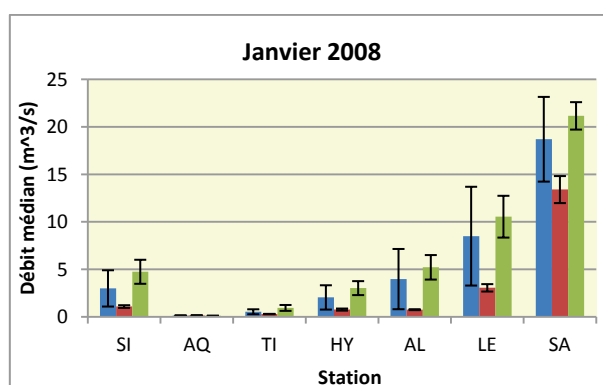


Figure 57 : débit médian pour la période complète (bleu), pour la période de pré-incubation (rouge), pour la période d'incubation (vert).

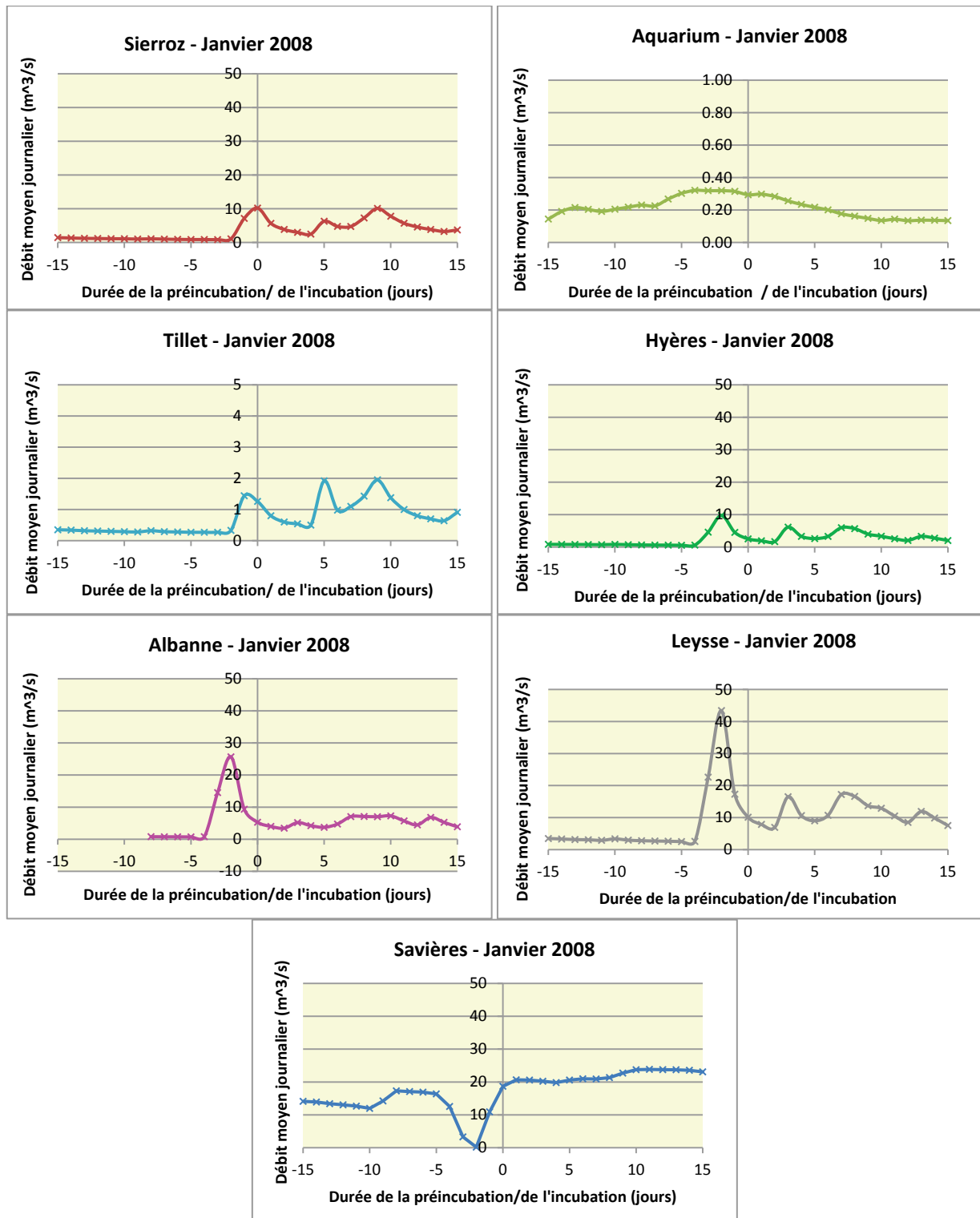


Figure 58 : suivi des débits lors de la campagne de janvier 2008.

5.2.4 Mars 2008

Au cours de la campagne du mois de mars 2008, le décalage dans le dépôt des substrats artificiels est d'une journée. Les stations Savières et Aquarium ont des débits stables jusqu'au septième jour puis ils augmentent jusqu'à la fin de l'incubation. Au cours de cette période, le débit est multiplié par 2 pour la station Aquarium et par 3 pour le canal de Savières.

Les autres stations présentent deux pics lors des jours 8 ou 9 et 13 ou 14 en fonction de la date de mise en place des lames. Pour toutes ces stations à l'exception de l'Albanne, le débit maximal du deuxième pic est supérieur à celui du premier. Mais le ΔQ est plus important pour le premier pic pour les stations Leyse, Hyères et Albanne (de 640 à 1028% pour le premier pic puis de 201 à 530% pour le second), sur le Sierroz et le Tillet c'est l'inverse avec un ΔQ qui passe de 295% à 317% au Sierroz et de 61 à 144% pour le Tillet.

Le débit médian n'est pas significativement différent entre les deux périodes suivies, mais on peut remarquer que les débits sont plus stables au cours de la période de pré-incubation que lors du développement des biofilms (Tableau 50, Figure 59 et Figure 60).

Le débit des stations Savières, Sierroz, Aquarium et Tillet présentent de très légères augmentations de débits ($\Delta Q < 40\%$) au cours de cette période. La Leyse ainsi que ses deux affluents présentent une augmentation de débit plus marquée au jour -6 (ΔQ de 84% à 193%). Une à deux autres augmentations suivent ensuite 3 jours avant la pose des substrats (ΔQ entre 15 et 64%) ainsi que le jour du dépôt pour la Leyse ($\Delta Q = 5\%$) et l'Hyères ($\Delta Q = 34\%$).

Tableau 50 : Coefficient de variation des débits par station et par période (mars 2008).

Station	CV _{MAD} période (%)	CV _{MAD} pré-incubation (%)	CV _{MAD} incubation (%)
Sierroz	12	7	33
Aquarium	12	2	10
Tillet	6	6	13
Hyères	30	11	63
Albanne	46	39	55
Leyse	31	21	48
Savières	9	8	7

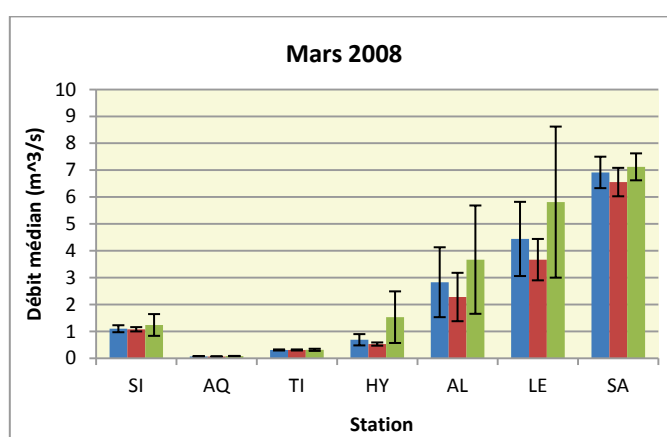


Figure 59 : débit médian pour la période complète (bleu), pour la période de pré-incubation (rouge), pour la période d'incubation (vert).

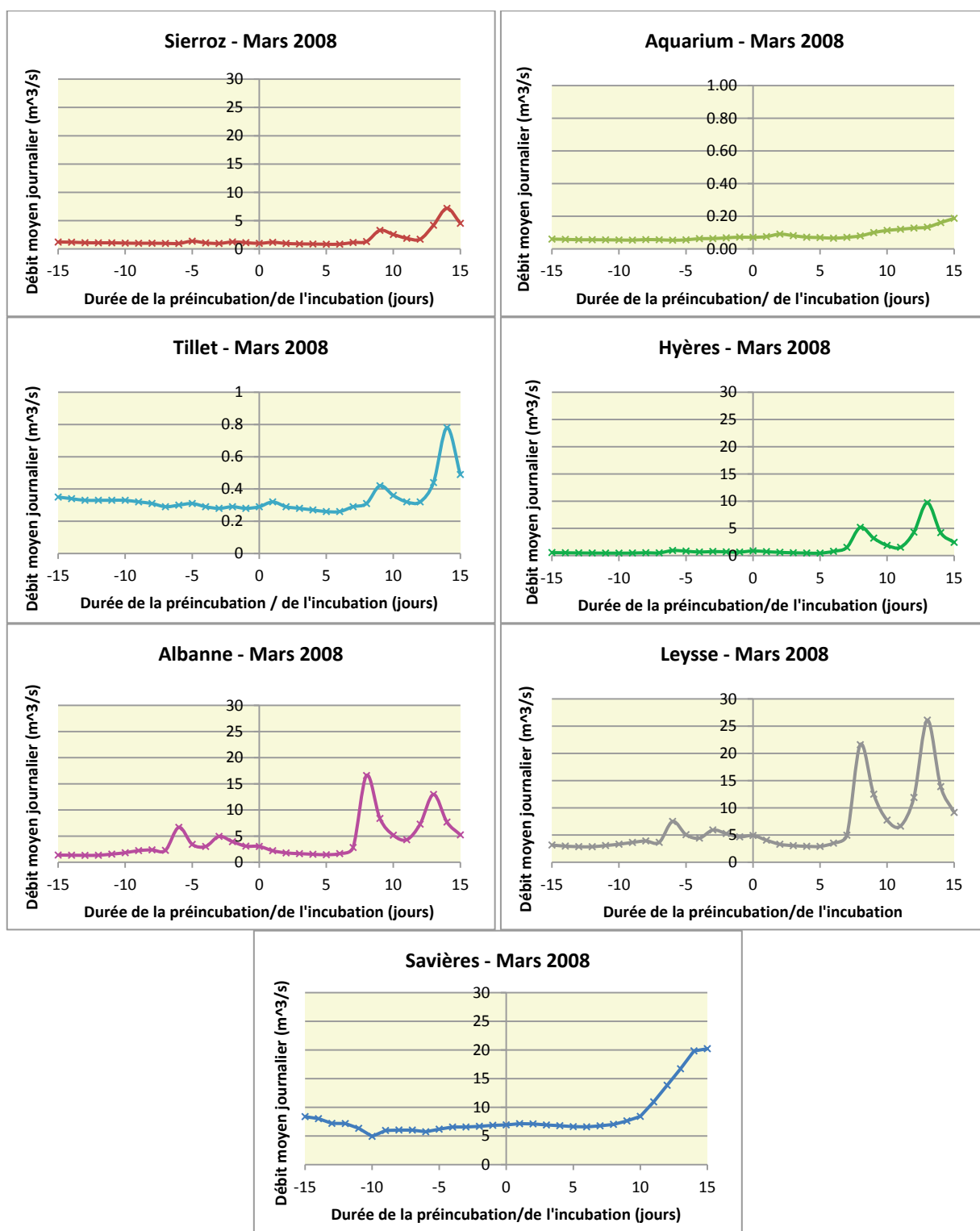


Figure 60 : suivi des débits lors de la campagne de mars 2008.

5.2.5 Mai 2008

En mai 2008, le dépôt des lames a été effectué avec 1 jour de décalage entre les 2 groupes stations. La station Albanne, présente un décalage plus important (13 jours par rapport à la Leysse et à l'Hyères), toujours suite à la perte des échantillons. Par conséquent, les deux augmentations de débit qui se sont produites à cette station lors de la pré-incubation (J-6 et J-9), correspondent aux augmentations des jours 4 et 7 des stations Leysse et Hyères, même si ces augmentations sont moins visibles au niveau de cette dernière station (Figure 61).

Les stations Savières et Aquarium présentent une baisse de leur débit moyen journalier tout au long du développement des biofilms. Le débit lors du retrait des biofilms est deux fois moins important à celui du dépôt des lames pour la station Aquarium, tandis qu'il diminue d'1/5 durant cette même période pour la station Savières. Au niveau des stations Sierroz et Tillet, une seule augmentation de débit est visible au cours de l'incubation, elle se situe au niveau du cinquième jour ($\Delta Q = 13\%$ dans le Tillet et 18% dans le Sierroz). Les stations Leysse et Hyères présentent la même augmentation qui correspond au quatrième jour d'incubation ($\Delta Q = 21$ et 29% respectivement) mais une deuxième augmentation a lieu au septième jour ($\Delta Q = 29$ et 36% respectivement). Enfin, la station Albanne présente une très faible augmentation de débit au troisième jour, plus globalement son débit diminue au cours de cette période pour passer de 3.24 à $1.28 \text{ m}^3/\text{s}$. Pour l'ensemble des stations à l'exception d'Aquarium, le débit augmente enfin au 14^{ème} et/ou 15^{ème} jour.

Pour toutes les stations le coefficient de variation reste inférieur à 30% pour la période d'incubation. Sauf pour la Leysse et l'Hyères, le coefficient de la période de pré-incubation est inférieur ou égal à celui de la période d'incubation (Tableau 51). Seules les stations Savières et Albanne présentent une différence significative de la médiane du débit moyen journalier entre ces deux périodes. Ces deux stations évoluent différemment entre ces 2 périodes, en effet, le débit médian est supérieur lors de l'incubation des lames dans le canal de Savières, tandis qu'il est inférieur pour cette même période dans l'Albanne (Figure 62).

La période de pré-incubation est marquée par une augmentation rapide 3 ou 4 jours avant le dépôt des lames selon la station (ΔQ compris entre 151% et 649% aux stations Aquarium et Sierroz respectivement). Jusqu'à cette date le débit diminue progressivement sauf au niveau de la station Aquarium qui présente un comportement particulier, avec une oscillation du débit autour d'une valeur de $0.20 \text{ m}^3/\text{s}$ jusqu'au cinquième jour avant la pose des lames. Puis, pendant les 5 derniers jours, le débit augmente, cette augmentation représente un ΔQ de 151% . En raison du décalage de la période d'incubation au niveau de la station Albanne, deux légères augmentations de débits sont observables à cette station aux jours -9 et -6 ($\Delta Q = 33$ puis 44%). Enfin, comme pour la station Aquarium, le débit du canal de Savières a tendance à osciller avant de chuter brusquement 4 jours avant l'incubation. Cette chute est suivie d'une hausse plus importante ($\Delta Q = 374\%$) qui se poursuit jusqu'au premier jour de l'incubation.

Tableau 51 : Coefficient de variation des débits par station et par période (mai 2008).

Station	CV _{MAD} période (%)	CV _{MAD} pré-incubation (%)	CV _{MAD} incubation (%)
Sierroz	30	28	29
Aquarium	22	13	14
Tillet	16	10	23
Hyères	27	37	23
Albanne	30	13	28
Leysse	20	26	14
Savières	10	5	5

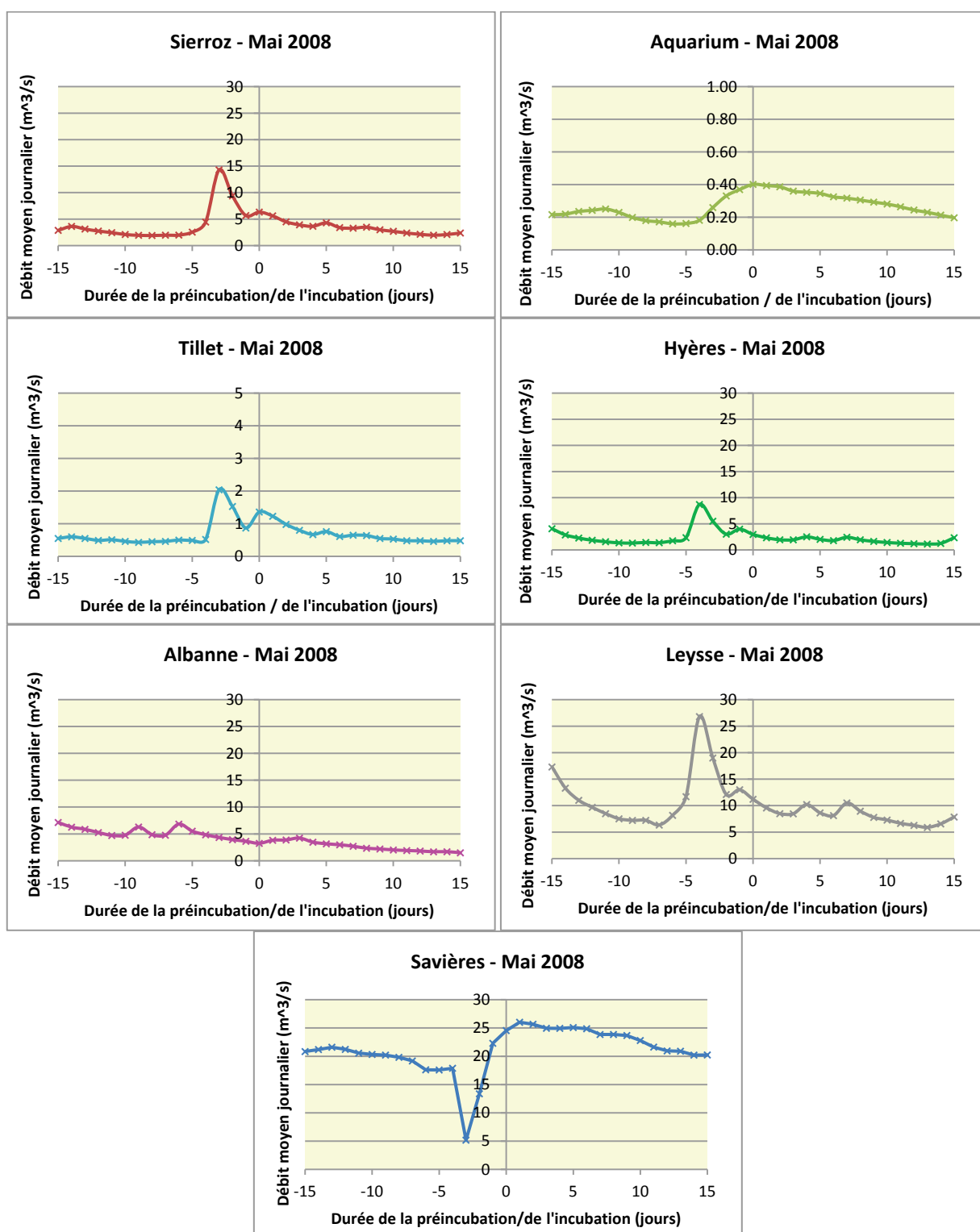


Figure 61: suivi des débits lors de la campagne de mai 2008.

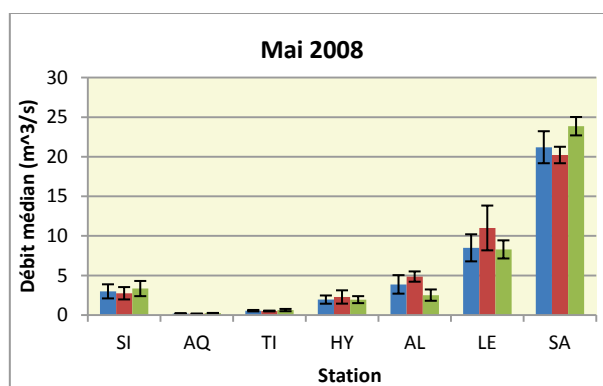


Figure 62 : débit médian pour la période complète (bleu), pour la période de pré-incubation (rouge), pour la période d'incubation (vert).

5.2.6 Juillet 2008

En juillet 2008, la station Sierroz subit un décalage de 10 jours par rapport aux autres stations habituellement échantillonnées simultanément. Pour l'ensemble des autres stations, le décalage est d'un jour entre les deux groupes.

Le comportement des débits au niveau du Canal de Savières se singularise, avec des variations très marquées (Tableau 52, Figure 63 et Figure 64). On observe une très forte baisse du débit au cours des 4 premiers jours de l'incubation jusqu'à l'obtention d'un débit nul voire faiblement négatif durant deux jours, puis le débit augmente jusqu'au treizième jour avant de se stabiliser pour les jours restants.

Le débit de la station Aquarium est stable autour de sa valeur médiane ($CV_{MAD}=3\%$) qui est de $0.263 \text{ m}^3/\text{s}$. Au cours de cette campagne, il faut noter que le débit médian au niveau de la station Aquarium est supérieur au débit médian du Tillet. En termes de débit journalier moyen, Aquarium reste supérieure au Tillet tout au long de la période d'incubation. Seuls quelques jours durant la période de pré-incubation voient la situation s'inverser.

La station Sierroz montre, quant à elle, une diminution progressive de son débit malgré de légères augmentations de 15 et 16% pour les jours 5 et 11 ; il passe ainsi tout au long de l'incubation de 1.32 à $0.46 \text{ m}^3/\text{s}$. Le débit de la station Tillet est stable malgré la présence de légers pics au premier, septième et treizième jour d'incubation; 14, 50 et 11% respectivement). Le groupe de stations Leyse, Hyères et Albanne montre 2 augmentations temporaires de leurs débits, la première au jour 4 (ΔQ compris entre 67 et 71%) et la deuxième au jour 10. Cette deuxième augmentation se poursuit le jour 11 pour les stations Leyse et Hyères où elle représente alors une variation de débit de 46 et 162% respectivement contre seulement 19% à la station Albanne.

D'une manière générale, le débit médian sur ces deux périodes n'est pas significativement différent à l'intérieur de chacune des stations.

Pour les stations Sierroz, Leyse, Hyères et Albanne, la période de pré-incubation est caractérisée par 3 pics de débits. Ces pics ont lieu autour des jours -12, -9 et -2 pour le Sierroz. Et sont décalés d'un jour (-13, -10 et -3) pour les autres stations. Au cours de ces augmentations, le débit va au minimum doubler et peut atteindre un ΔQ de 620% (Hyères aux jours -3 et -4).

Le canal de Savières présente une première augmentation de débit qui débute au jour -12, le débit stagne ensuite entre les jours -11 et -9 avant la reprise de son augmentation jusqu'au jour -7 ($\Delta Q=260\%$). Le débit chute ensuite brutalement avant d'augmenter à nouveau du jour -3 jusqu'au dépôt des lames (555%). La station Aquarium quant à elle présente une certaine stabilité concernant ses débits ($CV_{MAD}=7\%$).

Tableau 52 : Coefficient de variation des débits par station et par période (Juillet 2008).

Station	CV _{MAD} période (%)	CV _{MAD} pré-incubation (%)	CV _{MAD} incubation (%)
Sierroz	24	28	21
Aquarium	6	7	3
Tillet	33	23	17
Hyères	38	49	30
Albanne	25	33	18
Leyse	26	38	20
Savières	56	37	67

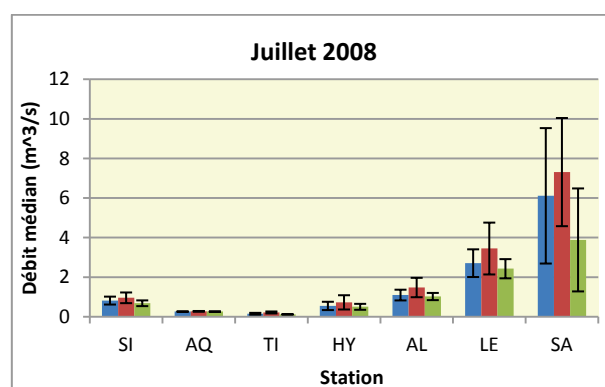


Figure 63 : débit médian pour la période complète (bleu), pour la période de pré-incubation (rouge), pour la période d'incubation (vert).

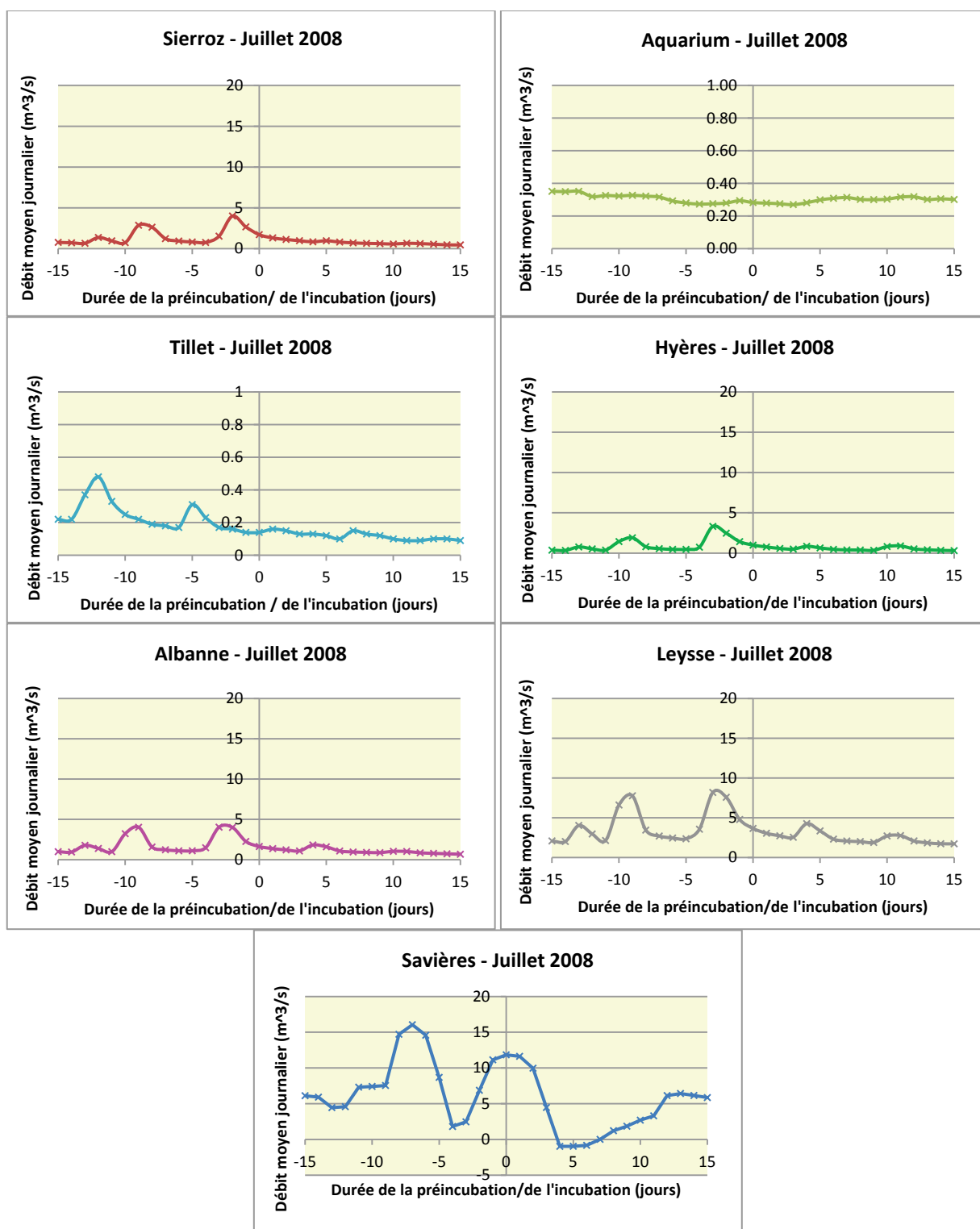


Figure 64 : suivi des débits lors de la campagne de juillet 2008.

5.2.7 Octobre 2008

La campagne effectuée au mois d'octobre 2008 est assez singulière. En effet, c'est la seule campagne où toutes les stations présentent le même comportement, à savoir une baisse de leur débit tout au long des deux périodes (Figure 66). Malgré cela, le débit médian n'est pas significativement différent entre ces deux périodes (Figure 65). On remarque tout de même que la baisse du débit est plus intense au cours de la période de pré-incubation qu'au cours du développement des biofilms. En effet, le CV_{MAD} est compris entre 23 et 38% lors de la pré-incubation et entre 7 et 24% lors de l'incubation (Tableau 53).

Au cours de la pré-incubation, il est possible d'observer la présence d'un plateau entre les jours -13 et -12 pour le Sierroz ou -14 et -13 pour la Leysse et l'Hyères. La diminution du débit est moins régulière au niveau du canal de Savières, elle est plus brutale entre les jours -12 et -6 et est ensuite suivie d'une légère ré-augmentation jusqu'à la veille de l'installation des substrats.

Lors de l'incubation, à l'exception des stations Savières et Aquarium, on remarque une légère et courte augmentation du débit au deuxième ou au troisième jour de l'incubation, représentant un ΔQ compris entre 11 et 66%, ainsi qu'une tendance du débit à augmenter à partir du treizième ou quatorzième jour de l'incubation (ΔQ variant de 26 à 171% selon la station).

Tableau 53 : Coefficient de variation des débits par station et par période (Octobre 2008).

Station	CV_{MAD} période (%)	CV_{MAD} pré-incubation (%)	CV_{MAD} incubation (%)
Sierroz	27	38	12
Aquarium	49	32	17
Tillet	15	23	7
Hyères	31	32	21
Albanne	22	34	13
Leysse	27	25	18
Savières	16	28	24

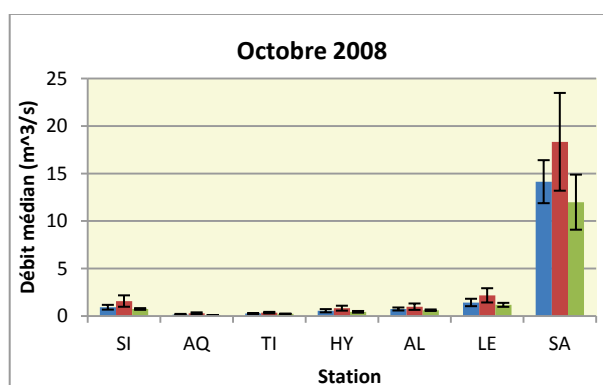


Figure 65 : débit médian pour la période complète (bleu), pour la période de pré-incubation (rouge), pour la période d'incubation (vert).

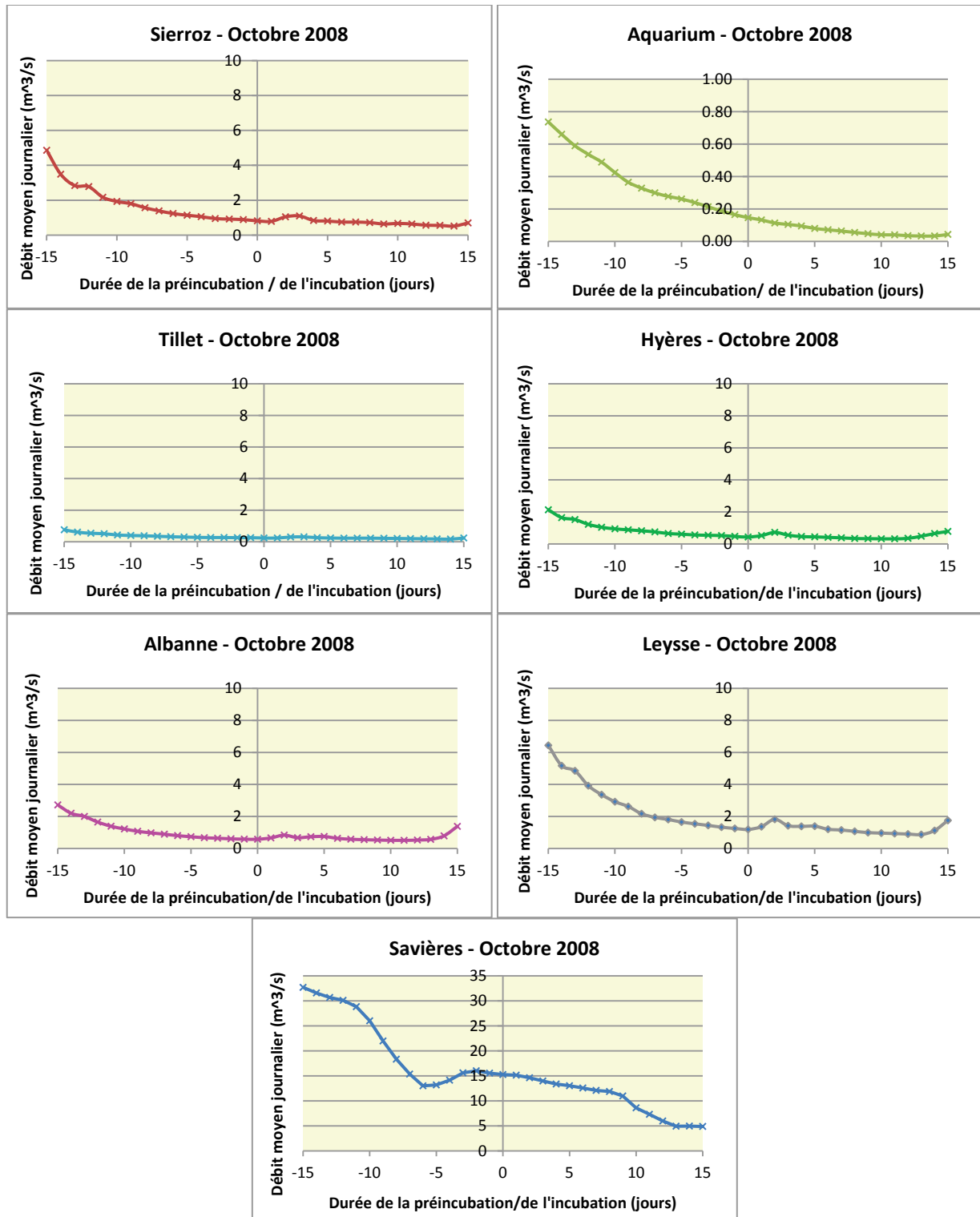


Figure 66: suivi des débits lors de la campagne d'octobre 2008.

5.2.8 Janvier 2009

En janvier 2009, le comportement des stations Savières et Aquarium se rapproche de celui des autres stations avec une baisse des débits sur une première partie de la période et une augmentation du débit au cours des derniers jours de l'incubation. Malgré cela, la baisse observée au début du développement des biofilms est plus marquée au niveau de la station Savières avec un passage de 10 à 3 m³/s en 4 jours. L'augmentation du débit à la fin de l'incubation est marquée à partir des jours 13 ou 14 en fonction de la station, mais elle commence lentement lors des jours précédents. L'augmentation du débit de ce pic est comprise entre 210% à Savières et 2226% sur la Leysse.

La station Tillet présente une évolution des débits différente des autres stations avec une augmentation marquée du débit au jour 2 ($\Delta Q=290\%$). Ceci est dû à un nouveau problème d'échantillonnage qui a engendré un décalage de 15 jours lors du dépôt des lames. Pour cette station, c'est donc la période de pré-incubation qui correspond à la période d'incubation des autres stations. Pour les autres stations, un jour sépare le dépôt des lames entre les 2 groupes.

Toutes les stations montrent une différence significative entre les débits médians des deux périodes suivies. Cette différence va toujours dans le sens d'une baisse du débit médian entre la période de pré-incubation et la période d'incubation, à l'exception de la station Tillet (Figure 67).

Pour l'ensemble des stations, une seule augmentation de débit caractérise la période de pré-incubation. Elle a lieu autour des jours :

- -4 à Savières ($\Delta Q=44\%$),
- -5 au Sierroz ($\Delta Q=395\%$),
- -1 au Tillet ($\Delta Q=273\%$),
- -6 pour Aquarium ($\Delta Q=44\%$), la Leysse et ses deux affluents (ΔQ compris entre 97 et 129%).

Une fois encore, la station Aquarium est celle dont les variations sont les moins fortes ($CV_{MAD}=4\%$ pour chacune des deux périodes), tandis que la variabilité des débits au cours de ces périodes est du même ordre de grandeur pour les autres stations (CV_{MAD} compris entre 12 et 26%) (Tableau 54).

Tableau 54 : Coefficient de variation des débits par station et par période (Janvier 2009).

Station	CV _{MAD} période (%)	CV _{MAD} pré-incubation (%)	CV _{MAD} incubation (%)
Sierroz	41	15	20
Aquarium	4	4	4
Tillet	30	11	14
Hyères	42	25	12
Albanne	40	21	16
Leyse	45	24	23
Savières	28	3	26

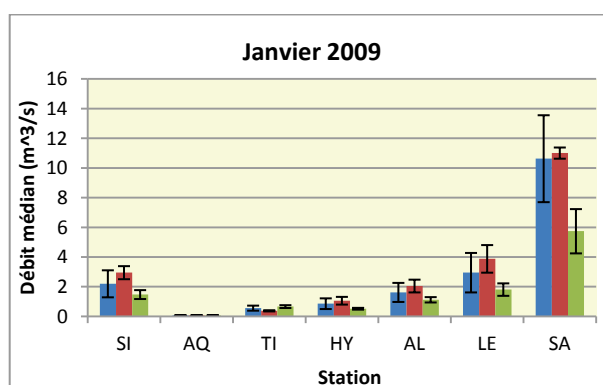


Figure 67 : débit médian pour la période complète (bleu), pour la période de pré-incubation (rouge), pour la période d'incubation (vert).

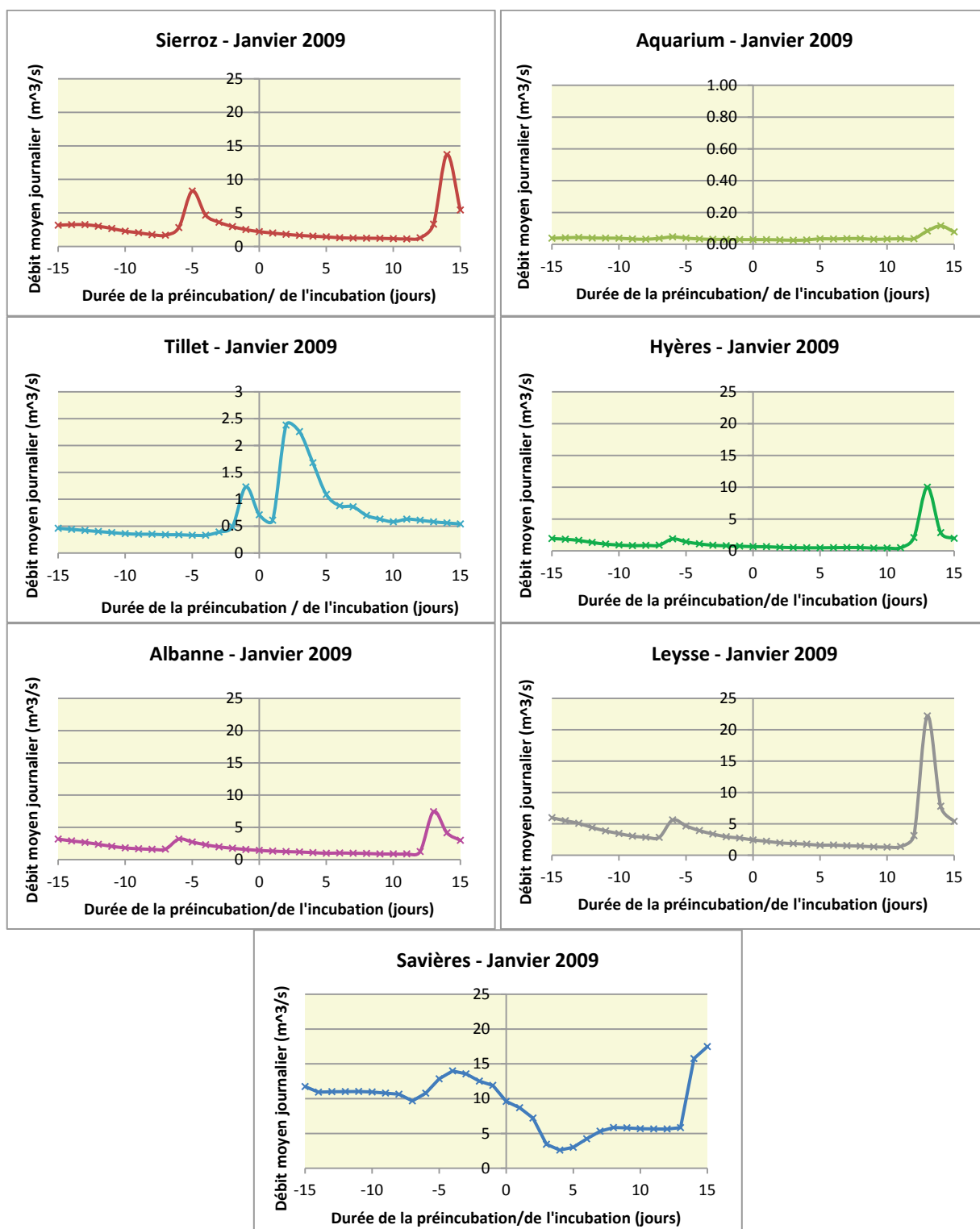


Figure 68 : suivi des débits lors de la campagne de janvier 2009.

5.2.9 Mai 2009

La dernière campagne, effectuée en mai 2009, présente un décalage d'un jour entre les deux groupes de stations lors de la mise en place des lames.

La station Savières est la plus variable durant la période d'incubation (Tableau 55), elle montre tout d'abord une hausse de son débit jusqu'au quatrième jour, pendant cette période le débit double pour atteindre une valeur de $10 \text{ m}^3/\text{s}$, puis il chute brutalement, en deux jours il devient nul. Il augmente ensuite à nouveau pendant 3 jours pour atteindre un débit de $6.5 \text{ m}^3/\text{s}$ ($\Delta Q = 1148\%$) autour duquel il se stabilise durant les jours restants.

Le débit de la station Aquarium est très faible (environ $0.04 \text{ m}^3/\text{s}$) et il reste assez stable tout au long de cette période ($CV_{MAD}=3\%$).

Les autres stations présentent une légère augmentation au premier ou au deuxième jour de l'incubation (ΔQ =entre 12 et 43%). Elle s'accompagne d'une autre légère augmentation au quatorzième jour sur le Sierroz ($\Delta Q=49\%$) et au dixième jour sur la Leysse et ses affluents (ΔQ de 9 à 20%).

D'une manière générale, le débit médian est inférieur au cours de la période d'incubation par rapport à celle de pré-incubation.

La période de pré-incubation est moins variable que la période d'incubation pour cette dernière campagne, à l'exception de la station Albanne. Une première augmentation s'effectue autour du dixième jour précédant le début de l'incubation ($\Delta Q < 61\%$ sauf pour la station Aquarium où elle atteint 221%), tandis que la dernière augmentation s'effectue la veille ou 2 jours avant celui-ci en fonction de la station ($\Delta Q < 61\%$ sauf pour la station Aquarium où elle atteint 119%).

Tableau 55 : Coefficient de variation des débits par station et par période (mai 2009).

Station	CV _{MAD} période (%)	CV _{MAD} pré-incubation (%)	CV _{MAD} incubation (%)
Sierroz	23	7	17
Aquarium	9	3	3
Tillet	20	9	14
Hyères	26	9	20
Albanne	27	28	21
Leyse	28	17	26
Savières	25	12	34

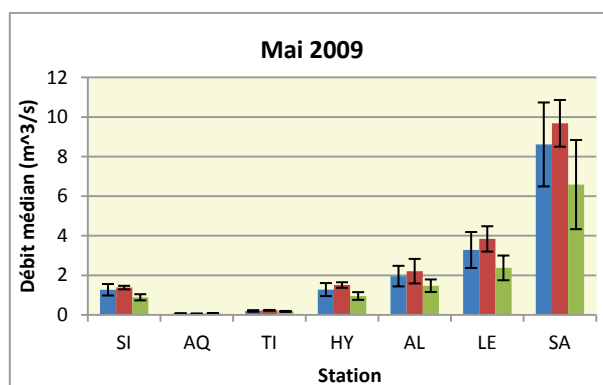


Figure 69 : débit médian pour la période complète (bleu), pour la période de pré-incubation (rouge), pour la période d'incubation (vert).

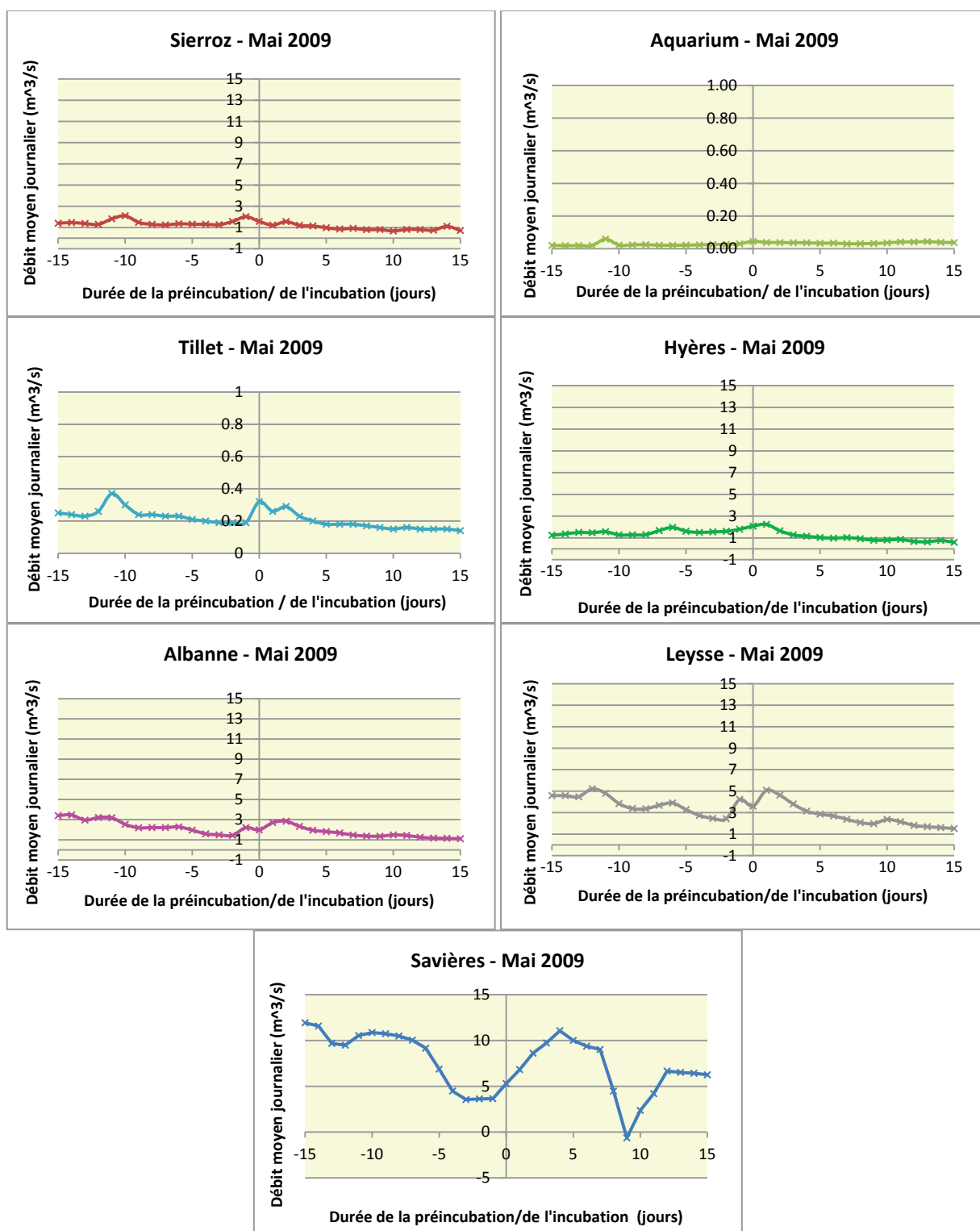


Figure 70: suivi des débits lors de la campagne de mai 2009.

Dans le but de résumer les caractéristiques générales des débits de chaque station lors de chaque campagne, le Tableau 56 regroupe les débits minimums, maximums et médians des périodes de pré-incubation et d'incubation.

Tableau 56: Tableau de synthèse des caractéristiques des débits par station et par campagne pour la période précédant l'incubation des biofilms et pour la période d'incubation elle-même.

juil-07							oct-07						
Station	pré-incubation			incubation			Station	pré-incubation			incubation		
	Débit min	Débit max	Débit médian	Débit min	Débit max	Débit médian		Débit min	Débit max	Débit médian	Débit min	Débit max	Débit médian
Sierroz	0.600	3.380	0.910	0.560	1.730	0.790	Sierroz	0.390	4.260	0.860	0.780	2.240	1.160
Aquarium	0.158	0.192	0.353	0.154	0.184	0.327	Aquarium	0.166	0.233	0.368	0.078	0.248	0.299
Tillet	0.150	0.610	0.220	0.130	0.560	0.170	Tillet	0.100	0.520	0.140	0.140	0.320	0.190
Hyères	0.320	3.440	0.650	0.390	2.590	0.590	Hyères				0.410	0.820	0.520
Albanne							Albanne						
Leyse	1.560	13.200	2.900	1.610	8.120	2.425	Leyse	1.190	17.800	2.360	1.450	4.890	2.500
Savières	-0.276	12.993	5.209	-0.874	9.756	5.814	Savières	-0.262	11.788	5.788	2.463	22.072	17.315

janv-08							mars-08						
Station	pré-incubation			incubation			Station	pré-incubation			incubation		
	Débit min	Débit max	Débit médian	Débit min	Débit max	Débit médian		Débit min	Débit max	Débit médian	Débit min	Débit max	Débit médian
Sierroz	0.850	7.140	1.090	2.490	10.200	4.750	Sierroz	0.970	1.370	1.080	0.830	7.170	1.240
Aquarium	0.100	0.199	0.226	0.100	0.187	0.170	Aquarium	0.063	0.073	0.056	0.071	0.139	0.086
Tillet	0.270	1.440	0.300	0.500	1.950	0.945	Tillet	0.280	0.350	0.310	0.260	0.780	0.315
Hyères	0.550	9.740	0.770	1.690	6.150	3.030	Hyères	0.460	0.940	0.530	0.460	9.710	1.530
Albanne	0.200	2.670	0.759	0.900	2.280	5.220	Albanne	0.270	0.350	0.280	0.190	2.370	3.670
Leyse	2.500	43.400	3.060	6.930	17.200	10.550	Leyse	2.860	7.500	3.670	2.920	26.100	5.810
Savières	0.194	17.309	13.404	18.702	23.848	21.165	Savières	4.927	8.374	6.556	6.589	20.226	7.123

mai-08							juil-08						
Station	pré-incubation			incubation			Station	pré-incubation			incubation		
	Débit min	Débit max	Débit médian	Débit min	Débit max	Débit médian		Débit min	Débit max	Débit médian	Débit min	Débit max	Débit médian
Sierroz	1.910	14.300	2.750	1.970	6.330	3.345	Sierroz	0.660	4.000	0.960	0.460	1.720	0.685
Aquarium	0.128	0.272	0.220	0.156	0.298	0.312	Aquarium	0.240	0.302	0.319	0.236	0.277	0.301
Tillet	0.430	2.040	0.510	0.460	1.360	0.625	Tillet	0.140	0.480	0.220	0.090	0.160	0.120
Hyères	1.320	8.690	2.280	1.140	2.970	1.945	Hyères	0.330	3.310	0.730	0.300	0.990	0.505
Albanne	0.540	1.350	4.860	0.270	0.750	2.515	Albanne	0.150	0.850	1.480	0.100	0.560	1.025
Leyse	6.340	26.800	11.000	5.890	11.200	8.290	Leyse	2.010	8.180	3.450	1.720	4.260	2.430
Savières	5.181	22.302	20.217	20.214	26.017	23.857	Savières	1.806	16.051	7.313	-0.972	11.836	3.886

oct-08							janv-09						
Station	pré-incubation			incubation			Station	pré-incubation			incubation		
	Débit min	Débit max	Débit médian	Débit min	Débit max	Débit médian		Débit min	Débit max	Débit médian	Débit min	Débit max	Débit médian
Sierroz	0.890	4.860	1.570	0.520	1.100	0.735	Sierroz	1.670	8.260	2.950	1.110	13.700	1.475
Aquarium	0.158	0.770	0.329	0.068	0.145	0.060	Aquarium	0.065	0.077	0.038	0.062	0.126	0.034
Tillet	0.260	0.760	0.350	0.170	0.310	0.230	Tillet	0.330	1.230	0.380	0.540	2.380	0.665
Hyères	0.470	2.130	0.820	0.320	0.780	0.435	Hyères	0.740	1.930	1.060	0.430	10.000	0.520
Albanne	0.200	0.770	0.977	0.150	0.340	0.606	Albanne	0.360	1.040	2.050	0.260	2.370	1.123
Leyse	1.250	6.440	2.170	0.870	1.820	1.170	Leyse	2.750	5.980	3.880	1.300	22.200	1.810
Savières	13.011	32.696	18.334	4.888	15.264	11.982	Savières	9.674	13.981	11.007	2.600	17.472	5.742

mai-09						
Station	pré-incubation			incubation		
	Débit min	Débit max	Débit médian	Débit min	Débit max	Débit médian
Sierroz	1.250	2.110	1.380	0.680	1.580	0.890
Aquarium	0.057	0.087	0.022	0.066	0.077	0.037
Tillet	0.190	0.370	0.230	0.140	0.320	0.175
Hyères	1.250	1.970	1.510	0.600	2.250	0.955
Albanne	0.230	0.590	2.210	0.150	0.390	1.475
Leyse	2.430	5.220	3.840	1.520	5.080	2.375
Savières	3.549	11.925	9.681	-0.634	11.066	6.586

Quelle que soit la campagne, le classement des stations en fonction de leur débit reste quasiment toujours le suivant : Savières, Leysse, Albanne, Hyères, Sierroz, Tillet, Aquarium. On peut remarquer que ce classement ne suit pas exactement la taille du bassin versant de chacune de ces rivières (Tableau 3). Les stations Hyères et Albanne sont toutes les deux situées sur deux affluents de la Leysse. L'affluent sur lequel se situe la station Albanne, c'est-à-dire l'ensemble des cours d'eau Leysse et Albanne, constitue une plus grosse participation que l'Hyères dans la partie aval de la Leysse.

A travers la valeur médiane du débit au cours du développement des biofilms, on remarque que les débits minimums ne sont pas observés simultanément sur toutes les stations:

- juillet 2008 : Savières
- octobre 2008 : Sierroz, Leysse, Hyères, Albanne
- janvier 2009 : Aquarium (valeur proche en octobre 08 et mai 09).

La même observation peut être effectuée concernant le débit médian maximal:

- mai 2008 : Savières et Aquarium
- janvier 2008 : Sierroz, Tillet, Leysse, Hyères, Albanne

A partir de l'étude de ces débits, il est possible de montrer que les stations Savières et Aquarium ont un comportement particulier pour presque l'ensemble des campagnes. Ceci s'explique par la gestion des débits à travers un barrage sur le canal de Savières. Et probablement par les faibles débits obtenus au niveau de la station Aquarium. Si les débits se révèlent être un facteur important dans le développement des biofilms ainsi que dans la colonisation de ces biofilms par *Lpn*, il sera alors nécessaire de traiter individuellement chacune de ces deux stations.

5.3 Influence des événements hydrologiques sur le développement des biofilms

Toutes les augmentations de débit ne vont pas avoir les mêmes conséquences sur le développement des biofilms. Les deux principaux paramètres pris en compte sont donc : le moment de l'incubation auquel le changement de débit s'effectue, et l'intensité de ce changement.

Il est important de rappeler ici que la méthode de prélèvement des biofilms sur les substrats artificiels peut atténuer l'effet des changements d'hydrodynamisme du cours d'eau sur ces biofilms. De même que l'emplacement des dispositifs d'échantillonnage à proximité de la rive peut également leur permettre de bénéficier d'une protection de la part de la rive en fonction de sa morphologie et la création de zones abritées hydrodynamiquement (chapitre 3.1.1.2).

5.3.1 Etude des variations de débits

Peu d'études ont tenté d'identifier l'intensité des changements de débits nécessaire à l'arrachement de fragments de biofilms. Ceci est un phénomène complexe qui dépend également de l'épaisseur et de la densité du biofilm et donc de son âge, et du milieu dans lequel il se développe (débit moyen, richesse nutritive...) (Lau & Liu, 1993, Horn, *et al.*, 2003), mais aussi des espèces bactériennes qui le constituent. En 2003, Horn *et al.* ont montré qu'un doublement de la vitesse de l'eau et donc du débit dans des conduites pleines conduit à une perte rapide de morceaux du biofilm. Cette perte est très rapide et très brève, en effet, elle a uniquement lieu dans les premières minutes qui suivent le changement de débit.

Du fait de la rapidité de cet arrachage, nous avons donc considéré non plus l'amplitude totale des pics présentés précédemment, mais les variations de débits entre chaque jour de l'incubation (ΔQ_j ; détail du calcul dans le chapitre 3.4.2.5) puis comme l'on s'intéresse pour l'instant à l'arrachage des biofilms seuls les ΔQ_j positifs de la période d'incubation ont été considérés.

Nous avons alors tout d'abord choisi d'identifier les augmentations de débits seulement lorsque le débit d'un jour est supérieur de 100% à celui du jour précédent. Les résultats sont résumés dans le Tableau 57.

Tableau 57 : Dates correspondant au minimum à un doublement du débit par rapport au débit du jour précédent.

	Sierroz	Aquarium	Tillet	Hyères	Albanne	Leyse	Savières
Août 07	J7 (104%)		J6 (100%) J15 (146%)	J5 (331%) J14 (275%)	J5 (164%) J14 (323%)	J5 (162%) J14 (184%)	J7 (141%) J8 (1417%)
Janvier 08	J5 (153%)		J5 (184%)	J3 (264%)		J3 (138%)	
Mars 08	J9 (150%) J13 (144%)			J8 (241%) J12 (180%) J13 (125%)	J8 (486%)	J8 (335%) J13 (119%)	
Juillet 08				J10 (138%)			J7 (101%) J8 (13467%)
Janvier 09	J13 (161%) J14 (314%)	J13 (139%)	J2 (290%)	J12 (324%) J13 (381%)	J13 (501%)	J12 (125%) J13 (609%)	J14 (170%)
Mai 09							J10 (473%)

La campagne de janvier 2009 se distingue des autres car il s'agit de la seule campagne pour laquelle toutes les stations présentent au moins une date à laquelle le débit va au moins doubler. De plus, à l'exception de la station Tillet, cette augmentation a lieu au cours des derniers jours de l'incubation. Lors de la campagne de janvier 2008, lorsqu'une augmentation de débit est observée, elle se déroule toujours dans les premiers jours de l'incubation (J3 ou 5), nous pouvons donc considérer que le biofilm a le temps de se reconstruire avant la fin de l'incubation.

Ces informations ont ensuite été comparées aux graphiques représentant le poids sec des biofilms, leur concentration de matière organique, le pourcentage de biofilm qui est constitué de matière organique, mais aussi les concentrations des bactéries_{totales}, ceci afin d'essayer d'expliquer leurs variations entre les campagnes par la présence ou non d'une forte augmentation de débit au cours de la fin de la période d'incubation. Dans les faits, nous n'avons pas trouvé parmi nos résultats, de cas démonstratif de l'influence d'une augmentation de débit sur la « structure physique » des biofilms. Si l'on considère, par exemple, les variations de poids secs des biofilms à chaque station au cours des campagnes (Tableau 72), on remarque que les valeurs les plus basses sont généralement obtenues au niveau de la station Savières, tandis que les biofilms les plus chargés se situent aux stations Hyères et Sierroz. Les flèches indiquent des augmentations journalières de débits supérieures à 100% du débit initial au cours de la première semaine (flèches noires) ou au cours de la deuxième semaine (flèches rouges).

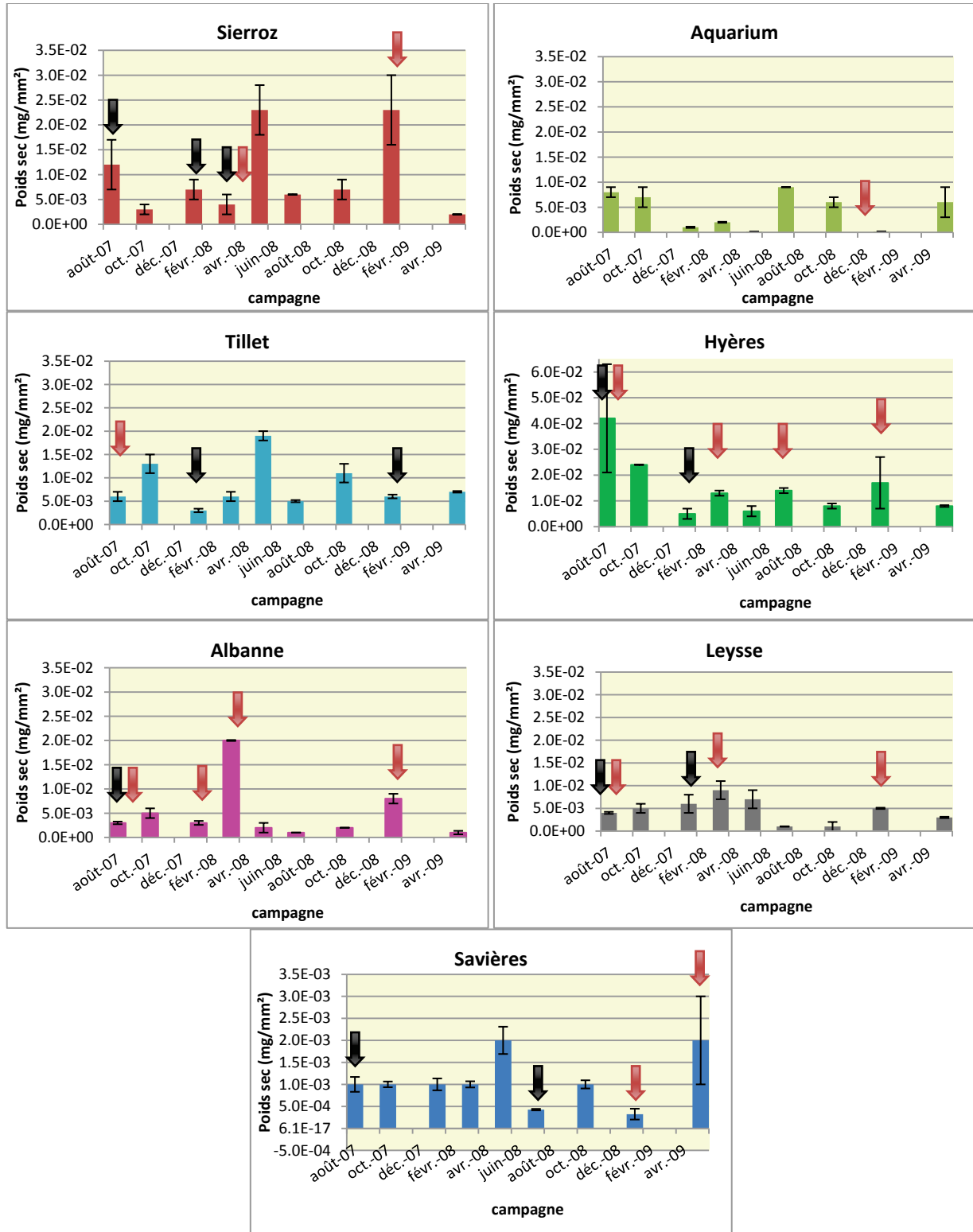


Figure 71: Poids sec des biofilms par station et par campagne. Les flèches noires représentent un $\Delta Q > 100\%$ survenu lors de la première semaine de l'incubation, les flèches rouges, un $\Delta Q > 100\%$ survenu lors de la deuxième semaine de l'incubation.

Sous cette forme, l'étude de ces événements hydrauliques ne permet donc pas d'expliquer les variations des poids secs des biofilms entre les différentes campagnes.

Nous avons ensuite considéré, les ΔQ_i compris entre 50 et 100% du débit du jour précédent (Tableau 58) en addition de ceux qui étaient supérieurs à 100%. N'obtenant pas plus de résultats, nous avons alors sélectionné l'ensemble des augmentations supérieures à 50% mais qui se sont produites sur les plus forts débits pour chacune des stations (valeurs en gras et soulignées). Nous avons qualifié ces augmentations de ΔQ significatives. On remarquera que ces variations "significatives" ont uniquement lieu lors des campagnes de janvier ou mai.

Tableau 58 : Dates correspondant au minimum à un ΔQ supérieur à 50% du débit du jour précédent (les valeurs en bleu indiquent un ΔQ compris entre 50% et 100% ; les valeurs en gras et souligné représentent les $\Delta Q > 50\%$ qui s'appliquent sur des débits importants).

	Sierroz	Aquarium	Tillet	Hyères	Albanne	Leyse	Savières
Août 07	J7 (104%)		J6 (100%)	J5 (331%)	J5 (164%)	J5 (162%)	J7 (141%)
	J15 (90%)		J7 (50%)	J13 (72%)	J14 (323%)	J13 (78%)	J8 (1417%)
			J15 (146%)	J14 (275%)		J14 (184%)	
			J16 (75%)				
Octobre 07	J5 (52%)		J5 (60%)			J4 (82%)	J2 (62%)
Janvier 08	J5 (153%)		J5 (184%)	J3 (264%)	J3 (51%)	J3 (138)	
	J8 (53%)			J7 (81%)	J13 (52%)	J7 (61%)	
				J13 (61%)			
Mars 08	J9 (150%)		J14 (77%)	J6 (72%)	J7 (70%)	J8 (335%)	
	J13 (144%)			J7 (92%)	J8 (486%)	J12 (79%)	
	J14 (71%)			J8 (241%)	J12 (69%)	J13 (119%)	
				J12 (180%)	J13 (78%)		
Mai 08				J13 (125%)			
Juillet 08				J15 (86%)			
			J7 (50%)	J4 (71%)	J4 (68%)	J4 (67%)	J7 (101%)
				J10 (138%)			J8 (13467%)
							J9 (51%)
Octobre 08					J15 (75%)	J15 (56%)	J12 (86%)
Janvier 09	J13 (161%)	J13 (139%)	J2 (290%)	J12 (324%)	J13 (501%)	J12 (125%)	J14 (170%)
	J14 (314%)			J13 (381%)		J13 (609%)	
Mai 09							J10 (473%)
							J11 (77%)
							J12 (59%)

Une recherche de corrélation entre ces descripteurs et les caractéristiques du biofilm (Tableau 59) est ensuite effectuée grâce au calcul du coefficient de Kendall (τ) avec un niveau de risque $\alpha=5\%$.

Tableau 59 : Liste des descripteurs des débits et des biofilms utilisés deux-à-deux dans la recherche de corrélation pour chaque station.

Descripteurs des débits	Descripteurs du biofilm
Débit médian (incubation, pré-incubation, total)	Poids sec du biofilm
Fréquence des Δ débit >50% (incubation, pré-incubation, total)	Matière organique du biofilm
Fréquence des Δ débit >100% (incubation, pré-incubation, total)	Proportion de matière organique
Fréquence des Δ débit significatifs (incubation, pré-incubation, total)	Bactéries _{totales}

Lorsque le poids sec du biofilm présente une corrélation avec l'un des paramètres de débits, cette corrélation est positive (Tableau 60). C'est le cas pour toutes les stations sauf Aquarium et Tillet. Cette augmentation entre le poids sec et le débit médian lors de l'incubation, ou la fréquence des variations significatives du débit au cours de la pré-incubation, ou encore la fréquence des doublements de débit au cours de l'incubation, peut avoir plusieurs origines. Elle peut tout d'abord s'expliquer par un meilleur renouvellement des nutriments au niveau du biofilm, permettant une meilleure croissance de celui-ci. Mais dans ce cas, les variations de débits devraient également être corrélées à la concentration de matière organique ou à la proportion de matière organique du biofilm, comme au niveau des stations Aquarium, Hyères et Albanne et Savières. Une autre hypothèse porte sur la remise en suspension de particules minérales dans la colonne d'eau lors de ces augmentations de débits. Ces particules se redéposeraient ensuite dans nos biofilms, provoquant ainsi une augmentation du poids sec des biofilms, mais pas de leur fraction organique.

La fraction organique du biofilm est généralement corrélée négativement avec les paramètres décrivant les débits (Tableau 60). Ceci va dans le sens de la dilution des nutriments dans la colonne d'eau simultanément à une augmentation du débit entraînant une moins bonne croissance du biofilm et des bactéries qui le constituent.

Tableau 60 : Corrélations significatives entre les caractéristiques des débits par station sur l'ensemble des campagnes (Débits médians par période, fréquence des $\Delta Q_j > 100$ ou à 50%, ΔQ_j significatifs et les principales caractéristiques des biofilms (poids sec, concentration de matière organique, proportion de matière organique (%m.o.), concentration de bactéries totales ; n=9).

Station	Corrélations positives	Corrélations négatives
Sierroz	Poids sec – Fréquence des Δ débit significatifs pré-incubation	%m.o. - Débit médian pré-incubation
Aquarium	Matière organique – Débit médian pré-incubation	Matière organique - Fréquence des Δ débit >100% en incubation Matière organique - Fréquence des Δ débit >50% en incubation
Tillet		Matière organique - Fréquence des Δ débit >100% en incubation Matière organique. - Fréquence des Δ débit significatif incubation %m.o. - Fréquence des Δ débit significatif incubation %m.o. - Débit médian incubation Bactéries totales - Fréquence des Δ débit >100% en pré-incubation Bactéries totales - Fréquence des Δ débit >50% en pré-incubation Bactéries totales – Débit médian pré-incubation+incubation
Hyères	Poids sec - Fréquence des Δ débit significatif pré-incubation Matière organique - Fréquence des Δ débit significatif pré-incubation	Poids sec m.o. – Débit médian pré-incubation+incubation %m.o. - Fréquence des Δ débit >100% en pré-incubation %m.o. - Fréquence des Δ débit >50% en pré-incubation %m.o. - Fréquence des Δ débit >50% en incubation Bactéries totales - Fréquence des Δ débit >100% en pré-incubation Bactéries totales - Fréquence des Δ débit >50% en pré-incubation
Albanne	Poids sec - Fréquence des Δ débit >100% en incubation Matière organique - Fréquence des Δ débit >100% en incubation	% m.o. - Fréquence des Δ débit significatif incubation Bactéries totales - Fréquence des Δ débit >100% en pré-incubation Bactéries totales - Fréquence des Δ débit >50% en pré-incubation
Leyse	Poids sec – Débit médian incubation Poids sec – Débit médian pré-incubation+incubation	% m.o. - Fréquence des Δ débit significatif incubation Bactéries totales - Fréquence des Δ débit >100% en pré-incubation Bactéries totales - Fréquence des Δ débit >50% en pré-incubation
Savières	Poids sec – Débit médian incubation % m.o. – Fréquence des Δ débit significatifs incubation	Matière organique – Débit médian pré-incubation % m.o. - Débit médian pré-incubation

Ces corrélations vont dans le sens d'une baisse de la fraction organique des biofilms en présence d'augmentations des débits. Elles peuvent parfois être couplées avec une hausse du poids sec du biofilm traduisant un apport de particules inorganiques. Ces particules ont pu être remises en suspension au cours de ces événements avant de rejoindre les biofilms. La baisse de la concentration en matière organique peut être une indication de l'augmentation de la densité du biofilm. Dans ce cas, nos résultats sont en accord avec les études ayant montré que d'importantes forces de cisaillement se traduisent par le développement d'un biofilm plus dense et plus solide (Kwok, *et al.*, 1998)

D'une manière générale les débits de pré-incubation et leurs variations semblent plus influencer le développement des biofilms que les débits observés pendant le développement même du biofilm (Tableau 60).

Les augmentations des débits, correspondant au minimum à son doublement, au cours de la période de pré-incubation sont résumées dans le Tableau 61. Le nombre d'événements est plus important qu'au cours de la période d'incubation : 56 augmentations pendant les pré-incubations contre 37 lors des incubations. Comme pour la période d'incubation, la station Aquarium est la moins marquée par les variations de débits. Les biofilms qui en résultent sont caractérisés par un faible poids sec, et par des concentrations bactériennes plus importantes que dans les autres stations (aussi bien pour les bactéries_{totales} que les bactéries_{cultivables} et leurs proportions). Le développement bactérien des biofilms est donc favorisé à cette station, peut-être grâce à un meilleur renouvellement des nutriments au sein du biofilm. Dans cette station, l'absence de lumière influence très probablement le développement des biofilms. Dans cette partie de notre travail, il s'agit, en effet, de la seule station qui soit souterraine.

Comme précédemment, on remarque une certaine homogénéité des résultats pour les stations Sierroz, Tillet, Lysse, Hyères et Albanne, avec un décalage correspondant au délai de dépôt des lames.

Tableau 61 : Dates correspondant au minimum à un doublement du débit par rapport au débit du jour précédent au cours de la période de pré-incubation.

	Sierroz	Aquarium	Tillet	Hyères	Albanne	Lysse	Savières
Août 07	J-12 (106%) J-6 (104%) J-5 (143%)	J-12 (100%) J-6 (118%)	J-8 (206%) J-7 (222%)	J-8 (306%) J-7 (177%)	J-14 (108%) J-8 (166%) J-7 (138%)	J-11 (559%)	
Octobre 07	J-13 (757%) J-1 (155%)	J-13 (264%) J-1 (148%)		J-14 (489%) J-4 (867%)	J-14 (264%) J-5 (166%) J-4 (308%)	J-13 (2891%) J-12 (127%)	
Janvier 08	J-1 (561%)	J-1 (336%)	J-3 (654%) J-2 (112%)	J-3 (1731%)	J-3 (783)	J-1 (5536%)	
Mars 08				J-6 (193%)	J-6 (104%)		
Mai 08	J-3 (221%)	J-3 (292%)	J-4 (270%)		J-4 (129%)	J-2 (158%)	
Juillet 08	J-12 (108%) J-9 (289%) J-3 (101%) J-2 (161%)		J-13 (130%) J-10 (286%) J-3 (353%)	J-10 (226%) J-3 (172%)	J-13 (101%) J-10 (209%) J-3 (130%)	J-2 (180%)	
Octobre 08							
Janvier 09	J-5 (194%)	J-1 (151%)	J-6 (111%)				
Mai 09		J-11 (204%)					

Comme pour l'étude de la période d'incubation, les augmentations de débits de plus de 50% qui se produisent sur de forts débits initiaux sont ensuite identifiées comme des variations « significatives » (Tableau 62).

Tableau 62 : Dates correspondant au minimum à un ΔQ supérieur à 50% du débit du jour précédent (période de pré-incubation).

	Sierroz	Aquarium	Tillet	Hyères	Albanne	Leyse	Savières
Août 07	J-12 (106%)		J-12 (100%)	J-14 (55%)	J-8 (306%)	J-14 (108%)	J-11 (559%)
	J-6 (104%)		J-6 (118%)	J-8 (206%)	<u>J-7 (177%)</u>	J-8 (166%)	J-10(68.4)
	J-5 (143%)			<u>J-7 (222%)</u>		<u>J-7 (138%)</u>	J-8 (84%)
Octobre 07	J-13 (757%)		J-13 (264%)		J-14 (489%)	J-14 (264%)	J-13 (2891%)
	J-6 (66%)		J-6 (64%)		J-7 (96%)	J-7 (98%)	J-12 (127%)
	J-4 (50%)		J-1 (148%)		J-4 (867%)	J-5 (166%)	
	J-3 (97%)					<u>J-4 (308%)</u>	
Janvier 08	J-1 (155%)						
	J-1 (561%)		J-1 (336%)	J-3 (654%)	J-3 (1731%)	J-3 (783)	<u>J-1 (5536%)</u>
Mars 08				<u>J-2 (112%)</u>	<u>J-2 (77%)</u>	<u>J-2 (92%)</u>	
				J-6 (84%)	<u>J-6 (193%)</u>	<u>J-6 (104%)</u>	
Mai 08				<u>J-3 (64%)</u>			
	<u>J-4 (75%)</u>		<u>J-3 (292%)</u>	<u>J-4 (270%)</u>		<u>J-4 (129%)</u>	J-2 (158%)
Juillet 08	<u>J-3 (221%)</u>		<u>J0 (56.3%)</u>				<u>J-1 (67%)</u>
	J-12 (108%)		J-13 (68%)	J-13 (130%)	J-13 (88%)	J-13 (101%)	J-11 (60%)
	J-9 (289%)		J-5 (82%)	J-10 (286%)	J-10 (226%)	J-10 (209%)	<u>J-8 (95%)</u>
	J-3 (101%)			J-4 (59%)	J-3 (172%)	J-4 (51%)	J-2 (180%)
Octobre 08	J-2 (161%)			J-3 (353%)		<u>J-3 (130%)</u>	<u>J-1 (62%)</u>
						J-6 (97%)	
Janvier 09	J-6 (68%)		<u>J-1 (151%)</u>	J-6 (111%)	J-6 (96%)		
	<u>J-5 (194%)</u>						
Mai 09		J-11 (204%)	<u>J0 (68%)</u>		J-1 (53%)		

Ces augmentations de débits pourraient expliquer des modifications dans les concentrations ioniques qui influenceraient le développement des biofilms dans les jours suivant les variations. Suite à l'étude de l'évolution des concentrations des différentes espèces ioniques au cours du temps pour chacune des stations, une recherche de corrélation a été effectuée entre ces descripteurs et les caractéristiques des débits (Tableau 63 et Tableau 64). L'analyse des corrélations obtenues va permettre de compléter les informations données pour chaque station.

Un paramètre supplémentaire a été pris en compte pour la recherche de corrélations entre les concentrations ioniques et les débits. Il s'agit des débits caractéristiques des périodes de prélèvements d'eau à partir desquels les analyses d'ions ont été réalisées, soit :

- le débit au moment du retrait de l'échantillonneur automatique,
- le débit médian durant la période d'échantillonnage (24 h),
- l'amplitude de variation du débit durant la même période (en valeur ou en %)

La prise en compte de ce paramètre est nécessaire en raison du décalage temporel qui existe entre les stations lors du prélèvement d'eau, décalage qui peut atteindre 2 semaines (Tableau 4).

Dans le canal de **Savières**, le poids sec du biofilm est positivement corrélé au débit médian de la période d'incubation, le pourcentage de matière organique est positivement corrélé au nombre de variations de débits significatifs au cours de cette même période, tandis que le débit médian de la période de pré-incubation est négativement corrélé à la fois au poids sec de matière organique et au pourcentage de matière organique du biofilm. D'une manière générale, on observe une corrélation positive entre le COD de l'eau et les variations de débits lors du prélèvement ou lors de la période d'incubation des lames. Les mêmes corrélations sont observées avec les espèces ioniques suivantes : chlorures, sulfates, potassium et magnésium. La concentration en calcium est, elle, positivement corrélée au débit de la période de pré-incubation.

Les précipitations qui engendrent des variations de débits lors de la période de pré-incubation ont tendance à favoriser la fraction inorganique du biofilm, probablement à travers un apport massif de particules en suspension. Si le cours d'eau est chargé en particules lors de la pose des substrats artificiels, le retour à un débit d'étiage favorise ensuite le dépôt des particules sur le substrat engendrant une augmentation du poids sec des biofilms. A l'inverse, les précipitations qui ont lieu pendant l'incubation des biofilms induisent un apport d'ions et de matière organique depuis le bassin versant favorisant ainsi le développement du biofilm. Selon les hypothèses précédentes, l'origine des différences engendrées par les augmentations de débit des 2 périodes (incubation ou pré-incubation) est donc fortuite.

Le comportement ionique au niveau de la station **Sierroz** est différent, on remarque que les augmentations de débits qui ont lieu lors du développement des biofilms vont avoir tendance à appauvrir l'eau en diluant les ions présents (sulfates, phosphates, calcium et sodium principalement). Le développement du biofilm semble, lui, plus affecté par le débit de la période de pré-incubation que par ces changements au cours de l'incubation des lames, probablement à travers une eau qui sera ensuite plus chargée en particules minérales lors du développement du biofilm.

A la station **Aquarium**, seuls les ions potassium et calcium sont positivement corrélés au débit d'incubation, le calcium l'est aussi au débit médian de la pré-incubation. Le magnésium est le seul ion à être négativement corrélé aux débits lors du prélèvement d'eau. Les corrélations précédemment observées pour cette station entre les débits et le pourcentage de matière organique du biofilm, ne peuvent pas être expliquées par les modifications de concentrations ioniques (autres que potassium, calcium ou magnésium). L'effet du débit et de ses variations à cette station est donc direct, il agit probablement en érodant le biofilm.

La réaction aux débits et à leurs variations dépend de l'espèce ionique concernée à la station **Tillet**.

Les phosphates et le calcium sont dilués par les augmentations de débit de la période d'incubation tandis que les nitrates, les chlorures, le sodium et le potassium et plus généralement la conductivité sont enrichis lors de variations de débit existant au cours de l'une ou l'autre des périodes. Le Tableau 60 montre des corrélations négatives entre les paramètres des débits d'une part et d'autre part la fraction organique du biofilm ou les concentrations bactériennes. L'étude des concentrations ioniques montre également que les variations de débits sont généralement corrélées positivement aux concentrations en nitrates mais négativement à celles en phosphates. Ces deux espèces ioniques étant nutritives, il se peut que les baisses des concentrations en phosphates engendrées par les augmentations de débit expliquent la diminution des concentrations bactériennes totales, qui participent alors à la baisse de la fraction organique du biofilm.

L'**Hyères** présente une corrélation positive entre les concentrations en phosphates et les variations de débits, l'origine de cet enrichissement en phosphates serait le lessivage des sols de son bassin versant. A l'inverse, les ions tels que les sulfates, les nitrates et le sodium sont dilués lors des augmentations des débits. Les débits, comme pour la Leyse en aval, augmentent le poids sec des biofilms, mais diminuent l'importance de leur fraction organique, probablement à travers l'apport de particules et l'appauvrissement général en éléments dissous. Ces modifications des biofilms correspondent donc à une augmentation de leur densité qui leur donnerait une meilleure résistance aux forces de cisaillement.

L'**Albanne** présente également un phénomène de dilution de certains ions (sulfates, phosphates et magnésium) lors des changements de débits. L'impact de ces changements de débits s'effectue donc comme précédemment par l'appauvrissement du milieu et l'apport de particules qui se traduisent par l'augmentation du poids sec du biofilm.

La **Leyse**, dans sa partie la plus aval, montre un enrichissement en nitrates, phosphates et potassium lors d'augmentations marquées des débits au cours de la période de pré-incubation. On note également un enrichissement en COD, en calcium, et plus généralement de la conductivité et du pH lorsque ces variations de débits s'effectuent durant la période de développement des biofilms. De plus, les observations précédentes concernant les corrélations entre les caractéristiques des débits et le développement du biofilm montrent que les augmentations de débits influeraient sur le développement des biofilms par un apport massif de particules inorganiques qui augmenterait le poids sec des biofilms tout en entravant son développement biologique.

Les corrélations avec les caractéristiques chimiques de l'eau dans laquelle se développent les biofilms sont opposées entre la station Leyse et ses deux affluents. Or entre la confluence des affluents et la station située la plus en aval, se trouve la station d'épuration de la ville de Chambéry qui peut, lors de conditions très particulières, déverser une partie de ses effluents dans la Leyse (lors du lessivage du site par exemple). Ces rejets peuvent donc être à l'origine des corrélations positives entre les variations de débits et les concentrations ioniques au niveau de la station la plus en aval.

Tableau 63 : Liste des descripteurs des débits et de la colonne d'eau utilisés deux-à-deux pour la recherche de corrélation à l'intérieur de chaque station.

Descripteurs des débits	Descripteurs de la colonne d'eau
Débit médian (incubation, pré-incubation, total)	
Fréquence des Δ débit >50% (incubation, pré-incubation, total)	Chlorures
	Sulfates
	Nitrates
Fréquence des Δ débit >100% (incubation, pré-incubation, total)	Phosphates
	Potassium
	Calcium
Fréquence des Δ débit significatifs (incubation, pré-incubation, total)	Magnésium
	Conductivité
	pH
Débits lors du prélèvement d'eau (retrait, médian et amplitude de variation lors du prélèvement d'eau)	COD

Tableau 64 : Corrélations significatives entre les caractéristiques des débits par station sur l'ensemble des campagnes (Débits médians par période, nombre de $\Delta Q_j > 100\%$ ou à 50% , ΔQ_j significatifs, débit et ΔQ lors du prélèvement d'eau servant à l'analyse chimique) et les caractéristiques chimiques dans lesquelles se développent les biofilms (COD, concentrations ioniques, conductivité, pH ; n=9).

Station	Corrélations positives	Corrélations négatives
Sierroz	Chlorures – Δ débit Isco Sulfates - Δ débit Isco	Sulfates – Débit au moment du retrait de l'ISCO Sulfates – Débit médian Isco Sulfates - Fréquence des Δ débit significatif incubation Sulfates – Débit médian incubation Phosphates - Fréquence des Δ débit significatif pré-incubation Calcium - Fréquence des Δ débit>100% incubation Calcium - Fréquence des Δ débit>50% incubation Sodium - Δ débit Isco Sodium - Δ débit Isco (%)
Aquarium	Potassium – Débit médian incubation Calcium – Débit médian pré-incubation Calcium – Débit médian incubation	Magnésium – Débit retrait Isco Magnésium – Débit médian Isco
Tillet	Chlorures - Fréquence des Δ débit>100% pré-incubation Sulfates - Fréquence des Δ débit>100% pré-incubation Nitrates – Débit retrait Isco Nitrates – Débit médian Isco Nitrates – Fréquence des Δ débit significatif incubation Nitrates – Débit médian pré-incubation Nitrates – Débit médian incubation Nitrates – Débit médian pré-incubation+incubation Potassium - Fréquence des Δ débit>50% pré-incubation Sodium - Fréquence des Δ débit>100% pré-incubation Sodium - Fréquence des Δ débit>50% pré-incubation Conductivité - Fréquence des Δ débit>100% pré-incubation Conductivité - Fréquence des Δ débit>100% incubation Conductivité – Débit médian incubation	Phosphates – Débit médian Isco Phosphates - Fréquence des Δ débit significatif incubation Phosphates – Débits pré-incubation Phosphates – Débit incubation Calcium - Fréquence des Δ débit>100% incubation Calcium - Fréquence des Δ débit>50% incubation Conductivité - Δ débit Isco (%)

Station	Corrélations positives	Corrélations négatives
Hyères	Phosphates - Fréquence des Δdébit significatif incubation pH - Fréquence des Δdébit significatif pré-incubation	Chlorures – débit médian incubation Sulfates – Débit retrait Isco Sulfates – débit médian Isco Sulfates - Fréquence des Δdébit significatif incubation Sulfates – Débit médian incubation Nitrates – Débit retrait Isco Nitrates – débit médian Isco Nitrates - Fréquence des Δdébit significatif incubation Nitrates – Débit médian incubation Calcium - Fréquence des Δdébit significatif pré-incubation Sodium – Débit retrait Isco Sodium – Débit médian Isco Sodium - Fréquence des Δdébit significatif incubation Sodium – Débit médian incubation
Albanne		Sulfates – Débit retrait Isco Sulfates – Débit médian Isco Sulfates - Fréquence des Δdébit significatif pré-incubation Sulfates - Fréquence des Δdébit significatif incubation Phosphates - Fréquence des Δdébit>100% incubation Phosphates – Débit médian pré-incubation Calcium - Fréquence des Δdébit significatif incubation Magnésium - Fréquence des Δdébit>50% pré-incubation Magnésium - Fréquence des Δdébit significatif pré-incubation Magnésium - Fréquence des Δdébit significatif incubation
Leysse	COD - Fréquence des Δdébit>100% incubation Nitrates - Fréquence des Δdébit>50% pré-incubation Phosphates - Fréquence des Δdébit>100% pré-incubation Phosphates - Fréquence des Δdébit>50% pré-incubation Potassium - Fréquence des Δdébit>100% pré-incubation Potassium - Fréquence des Δdébit>50% pré-incubation Calcium - Fréquence des Δdébit significatif incubation Conductivité - Fréquence des Δdébit>100% incubation pH – Débit retrait Isco pH – Débit médian Isco pH – Débit médian incubation	Chlorures - Fréquence des Δdébit significatif pré-incubation
Savières	COD - Fréquence des Δdébit significatif incubation Chlorures – Δdébit Isco Chlorures – Δdébit Isco (%) Chlorures – Fréquence des Δdébit>100% incubation Chlorures – Fréquence des Δdébit>50% incubation Sulfates - Fréquence des Δdébit>100% incubation Sulfates - Fréquence des Δdébit>50% incubation Potassium - Δdébit Isco Potassium - Δdébit Isco (%) Calcium – Débit médian pré-incubation Magnésium – Fréquence des Δdébit significatif incubation	Sulfates – Débit médian pré-incubation

5.3.2 Conclusions sur les variations hydrodynamiques et leurs conséquences

La réaction des biofilms aux variations de débits relève de processus complexes multiparamétriques (type de bassin versant, morphologie du lit, type de substrat...). La spécificité de la réaction de chaque cours d'eau (et donc de chaque station) n'est donc pas surprenante.

Elle peut également être due aux particularités d'apports extérieurs, tels que ceux qui ont été mis en évidence sur la Leysse, à l'aval de sa confluence avec l'Hyères, en liaison avec le lessivage du site de la station d'épuration de Chambéry.

A la vue des débits moyens journaliers et de l'ensemble des résultats, il semble évident que les cas des stations Savières et Aquarium doivent être traités séparément de celui des autres cours d'eau. Du fait de sa position dans le lac, la station Plage peut être rapprochée de la station Savières. Les trois stations situées sur la Leysse et ses affluents peuvent également être regroupées.

Les données de débits en notre possession pour ces stations sont uniquement des débits moyens journaliers, il est donc possible que cette valeur moyenne masque de plus fortes variations du débit instantané lors d'épisodes orageux. Les seuils utilisés pour la sélection des augmentations du débit journalier sont arbitraires et ont été définis en fonction des études préexistantes sur l'effet des changements de flux d'eau sur les biofilms.

Ces premiers résultats montrent que les modifications physico-chimiques entre les stations et entre les campagnes expliquent assez mal les évolutions des descripteurs des biofilms. En général, l'influence des modifications des débits est plus fréquente lorsqu'elles concernent la période de pré-incubation. Mais ceci peut simplement s'expliquer par la plus forte variabilité de cette période par rapport à la période d'incubation. De plus, chaque station ne répond pas de la même manière à la majorité de ces modifications, ce qui met en avant le caractère local des réponses. Certains descripteurs ont tout de même une réponse plus homogène. C'est le cas du poids sec des biofilms qui est généralement corrélé positivement avec différents paramètres du débit. Mais aussi de la fraction organique du biofilm, pour laquelle la corrélation avec les paramètres physico-chimiques est négative. Ces deux corrélations sont logiques, en effet, les variations de débits apportent des particules inorganiques plus lourdes qui peuvent expliquer l'augmentation du poids sec et la diminution de la fraction organique.

5.4 Occurrence de *Legionella pneumophila* (*Lpn*) dans les biofilms

L'un des objectifs de cet inventaire est d'identifier les affluents du Lac du Bourget caractérisés par une présence plus marquée de cette bactérie ainsi que les périodes caractérisant une intensification de leur présence. Les différents états physiologiques de cette bactérie (cultivables, FISH, totales) sont bien sûr considérés.

Après avoir décrit les évolutions des concentrations de *Lpn* des biofilms, et suite aux premières observations effectuées dans le chapitre précédent, nous essayerons d'identifier les caractéristiques de biofilms qui favorisent le développement de *Lpn*. Pour ce faire, nous chercherons d'éventuelles corrélations entre les descripteurs biologiques des biofilms en conservant le cadre des partitions de l'espace et du temps qui ont été définies dans le chapitre précédent.

5.4.1 Concentrations de *Lpn*_{totales}

La dispersion des données autour de la concentration médiane de *Lpn*_{totales} est très variable entre les stations, mais également entre les campagnes au sein d'une même station (Tableau 65). Elle reste fréquemment inférieure à 40% ce qui est très acceptable pour des données obtenues sur des biofilms naturels.

Tableau 65 : Variabilité (MAD/Médiane) inter-répliquat de la concentration de *Lpn*_{totales} (immuno).

	Août 07	Octobre 07	Janvier 08	Mars 08	Mai 08	Juillet 08	Octobre 08	Janvier 09	Mai 09
Sierroz	0%	43%	0%	0%	40%	0%	25%	0%	17%
Aquarium	7%	100%	33%	14%	9%	10%	0%	32%	21%
Tillet	83%	50%	100%	33%	0%	0%	17%	31%	0%
Terre Nue	39%	17%	18%	50%	33%	20%	0%	48%	14%
Hyères	25%	0%	0%	25%	11%	0%	12%	0%	37%
Albanne	0%	40%	25%	0%	0%	0%	11%	0%	9%
Leyse	0%	0%	50%	0%	50%	29%	40%	29%	26%
Plage	34%	67%	25%	17%	33%	11%	16%	52%	57%
Savières	36%	56%	33%	50%	33%	33%	0%	0%	29%

Les prélèvements effectués au cours de ces deux années montrent que tous les affluents du lac du Bourget abritent des *Lpn*. L'importance de leur concentration dépend de l'affluent lui-même, mais également de la période de développement du biofilm (Figure 72). Comme précédemment, pour des questions de clarté, les résultats sont présentés séparément pour chaque station.

Pour l'ensemble des affluents, les concentrations en *Lpn*_{totales} sont généralement inférieures à 100 *Lpn*/mm², mais elles peuvent ponctuellement dépasser 350 *Lpn*/mm² (Tableau 66).

Tableau 66 : Tableau récapitulatif des valeurs minimales, maximales et médianes de la concentration de *Lpn*_{totales} par station pour l'ensemble des campagnes.

STATION	MIN		MAX		MEDIANE	
	<i>Lpn</i> /mm ²	Campagne	<i>Lpn</i> /mm ²	Campagne	<i>Lpn</i> /mm ²	Campagne
SIERROZ	23	janv-09	340	août-07	95	oct-07
AQUARIUM	14	janv-09	215	oct-08	102	août-07
TILLET	27	oct-07 janv-08	336	oct-08	99	janv-09
TERRE NUE	18	janv-09	150	janv-08	91	oct-08
HYERES	43	janv-08	122	mai-08	68	juil-08
ALBANNE	21	mai-09	119	mai-08	57	juil-08
LEYSSE	41	oct-07	354	août-07	63	janv-09
PLAGE	9	janv-09	381	août-07	41	juil-08
SAVIERES	9	mars-08	170	août-07	27	mai-08

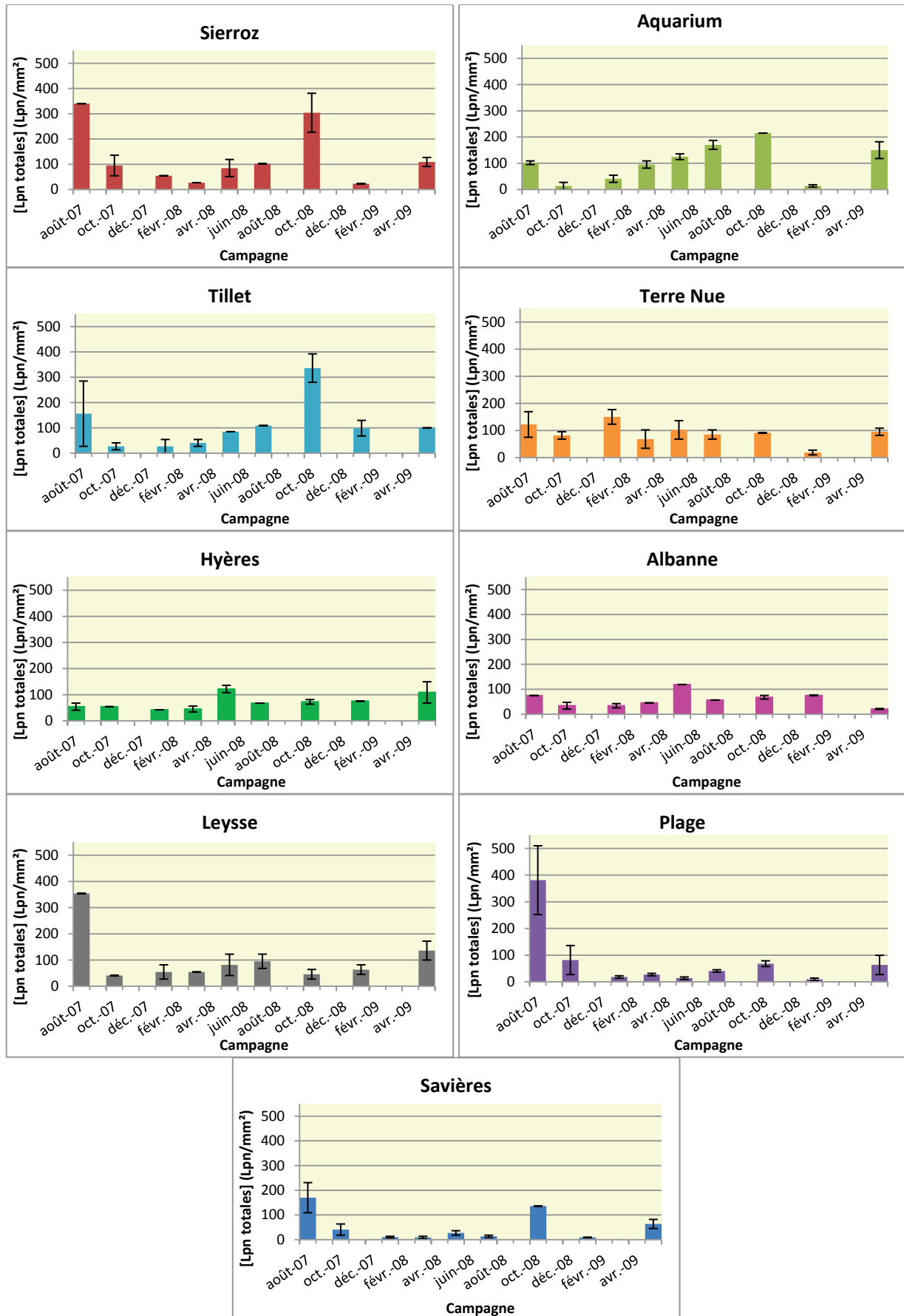


Figure 72: Evolution des concentrations en *Lpn*_{totales} (immuno) par station et par campagne.

L'occurrence de *Lpn* est importante au niveau de la station **Sierroz** avec des concentrations comprises entre 23 et 109 *Lpn*/mm², sauf au cours des campagnes d'août 2007 et d'octobre 2008 où les concentrations atteignent respectivement 340 et 304 *Lpn*/mm². On remarque également que les valeurs les plus faibles sont obtenues pour cette station en période hivernale ou au tout début du printemps (janvier 2008 et 2009 et mars 2009).

La station **Aquarium** présente une contamination plutôt forte mais surtout plus régulière que celle des autres stations. En effet, la concentration de *Lpn* est comprise entre 95 et 215 *Lpn*/mm² pour presque l'ensemble des campagnes. Seules les campagnes hivernales d'octobre 2007, janvier 2007 et 2008 sont moins contaminées avec des concentrations de 14 *Lpn*/mm² en octobre 2007 et janvier 2008 et de 41 *Lpn*/mm² en janvier 2007. Cette station est située à l'extrémité aval du réseau aixois recevant les eaux thermale (sources et bache de rejets). Les campagnes de janvier correspondent généralement avec la fin de la période de fermeture des établissements thermaux et avec les périodes de nettoyage de la bache de rejet (dont l'évacuation des boues qui se sont déposées tout au long de l'année).

L'évolution au niveau de la station **Tillet** ressemble à celle de la station Sierroz, avec des concentrations comprises entre 27 et 109 *Lpn*/mm² et des concentrations plus élevées en août 2007 et octobre 2008 qui sont respectivement de 156 et 336 *Lpn*/mm². Seule la concentration observée en janvier 2009 est plus élevée que celle du Sierroz. Les valeurs minimales restent observées pour les campagnes d'octobre 2007 et de janvier 2008.

La station **Terre Nue** présente des concentrations de *Lpn* assez stables comprises entre 58 et 150 *Lpn*/mm², avec la campagne de janvier 2009 qui est la seule à présenter une plus faible occurrence : 18 *Lpn*/mm². Le comportement de *Lpn* dans cette station est très différent entre les 2 campagnes effectuées en hiver, car la concentration est maximale est observée en janvier 2008. Les caractères de cette station, à savoir des conditions pseudo-stagnantes, mais également une eau fortement chargée en acides humiques (coloration importante de la colonne d'eau et même du biofilm), et le fait que ce canal longe en partie l'aéroport et puisse en recevoir une partie des eaux de ruissellement, peuvent expliquer l'absence de saisonnalité dans l'occurrence de *Lpn* dans les biofilms de cette station.

Les concentrations de *Lpn* sont intermédiaires pour les 3 stations situées sur le **bassin versant de la Leysse**. La station Leysse située la plus en aval contient légèrement plus de *Lpn*_{totales} que les stations situées sur les deux affluents principaux, c'est-à-dire la Leysse après sa confluence avec l'Albanne (station **Albanne**) et **l'Hyères**. La station Leysse présente des concentrations comprises entre 41 et 95 *Lpn*/mm², avec des valeurs plus fortes en août 2007 (354 *Lpn*/mm²) et en mai 2009 (136 *Lpn*/mm²). Les concentrations minimales sont observées entre les mois de janvier et mars pour les deux années que dure le suivi. Son affluent **l'Hyères** présente une concentration comprise entre 43 et 122 *Lpn*/mm². Pour chacune des deux années suivies, les concentrations sont minimales en janvier et mars de l'année 2008 et en janvier de l'année 2009. Tandis que les valeurs maximales sont observées au cours des campagnes de mai aussi bien pour l'année 2008 que pour l'année 2009. La station **Albanne** contient légèrement moins de *Lpn* (de 21 à 76 *Lpn*/mm²) avec une valeur supérieure uniquement en mai 2008 (119 *Lpn*/mm²). A l'inverse, c'est au mois de mai 2009 qu'est observée la plus faible concentration en *Lpn*. Au cours de l'année 2008, la plus faible concentration en *Lpn* est observée en janvier.

Lpn est généralement peu présente à la station **Plage** avec des concentrations de *Lpn*_{totales} inférieures à 85 *Lpn*/mm² sauf au cours de la première campagne où elle est de 381 *Lpn*/mm². Là encore, les concentrations les plus faibles sont obtenues au cours des campagnes hivernales ou au printemps. Ces concentrations sont de 18 *Lpn*/mm² en janvier 2008, 14 en mai 2008 et 9 en janvier 2009.

Enfin, la station **Savières** présente des concentrations en *Lpn* généralement faibles, inférieures à 65 *Lpn*/mm² sauf au cours des campagnes d'août 2007 et d'octobre 2008 où on compte respectivement 170 et 136 *Lpn*/mm². La valeur minimale de 9 *Lpn*/mm² est obtenue lors de deux campagnes : en mars 2008 et janvier 2009.

D'une manière générale, les concentrations des *Lpn*_{totales} varient en fonction de la saison, avec des valeurs minimales en hiver et de plus fortes concentrations en période estivale. L'occurrence de *Lpn* et son évolution permet de classer les stations ainsi :

- Savières et Plage : faible occurrence (<85 *Lpn*/mm²) ;
- Leysse, Hyères, Albanne (de 20 à 120 *Lpn*/mm²);
- Sierroz, Tillet, Terre Nue (de 20 à 330 *Lpn*/mm²);
- Aquarium : contamination plus marquée et plus stable (entre 95 et 215 *Lpn*/mm²).

Du fait de la stabilité des concentrations au niveau de la station Aquarium, nous faisons l'hypothèse que les *Lpn* apportées par les eaux thermales dans le réseau aixois se retrouvent dans les biofilms de ce réseau jusqu'à sa partie la plus en aval. Cette hypothèse sera étudiée plus en détail dans le volet suivant.

Il faut également considérer la part que représente *Lpn* au sein de la communauté bactérienne du biofilm. Les légionelles sont des composants minoritaires de la communauté bactérienne des biofilms échantillonnés. Elles représentent dans tous les cas moins de 10% de la concentration bactérienne totale et même le plus souvent moins de 1.5% de cette communauté (Figure 73 et Tableau 67). Les valeurs extrêmes sont tout de même importantes en raison du caractère pathogène de cette bactérie.

Tableau 67 : Tableau récapitulatif des valeurs minimales, maximales et médianes de la proportion de *Lpn*_{totales} (*Lpn*_{totales}/Bactéries_{totales}) par station pour l'ensemble des campagnes.

station	MIN		MAX		MEDIANE	
	% <i>Lpn</i>	campagne	% <i>Lpn</i>	campagne	% <i>Lpn</i>	campagne
SIERROZ	0.183	mars-08	5.56	août-07	0.959	oct.-07
AQUARIUM	0.202	janv.-08	1.67	mai-08	0.521	mars-08
TILLET	0.181	mars-08	1.7	oct.-08	0.642	mai-09
TERRE NUE	0.144	janv.-09	3.55	janv.-08	1	août-07
HYERES	0.53	oct.-08	2.16	août-07	1	oct.-07
ALBANNE	0.249	mai-09	1.47	août-07	0.873	mai-08
LEYSSE	0.418	mars-08	4.93	août-07	0.992	oct.-07
PLAGE	0.297	mai-09	2.44	août-07	0.735	juil.-08
SAVIERES	0.124	mars-08	8.11	oct.-08	0.557	janv.-09

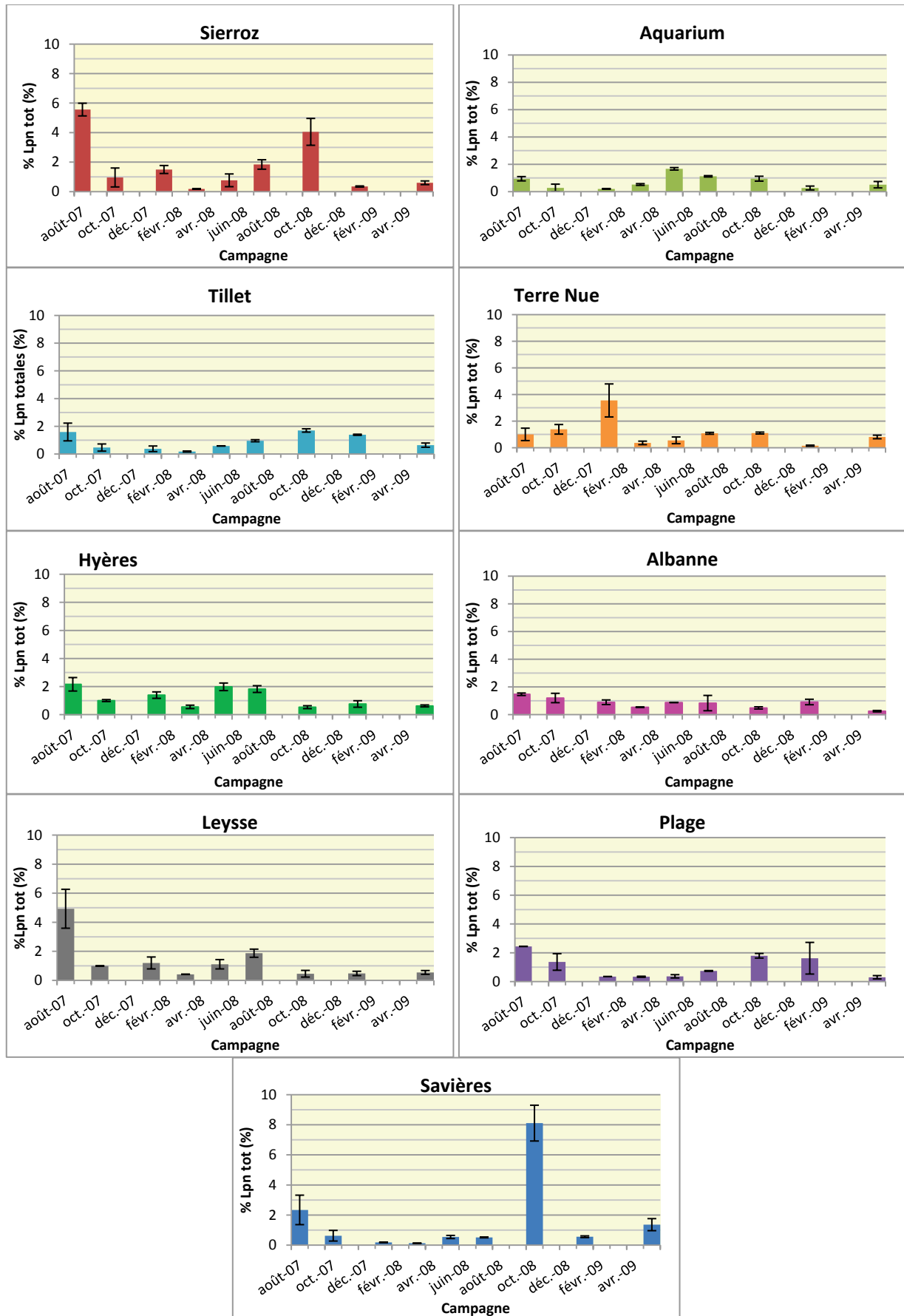


Figure 73 : Proportion de *Lpn*_{totales} dans la communauté bactérienne totale des biofilms.

L'évolution temporelle des proportions de *Lpn*_{totales} pour chaque station suit généralement celle de leurs concentrations. Ceci est bien marqué au niveau des stations **Savières**, **Sierroz**, **Aquarium**, **Tillet**, **Terre Nue** et **Leyse**.

Il faut toutefois noter que la station **Aquarium** qui présentait les plus fortes concentrations de *Lpn*_{totales} a également une communauté bactérienne plutôt développée engendrant ainsi une proportion de *Lpn* qui reste faible dans ces biofilms (<1.67%).

La station **Plage**, comme la majorité des stations, présente une concentration de *Lpn* élevée lors de la première campagne. Malgré cela, *Lpn* ne représente pas une fraction de la communauté bactérienne plus importante qu'aux autres dates. A l'inverse, au cours de la campagne de janvier 2009, la concentration de *Lpn* est faible mais elle représente une part de cette communauté qui est l'une des plus fortes par rapport aux autres campagnes.

La station **Terre Nue** montre une différence principale entre les concentrations et les proportions en *Lpn*, qui est observée en janvier 2008. Lors de cette campagne, la concentration en *Lpn* est peu différente de celle des autres campagnes, tandis que leur proportion est beaucoup plus importante (3.55%).

Les stations **Hyères** et **Albanne** sont celles qui sont les plus différentes. En effet, pour la station **Hyères**, la concentration de *Lpn* est supérieure en mai 2008 par rapport à celle du mois de juillet 2008, mais elles représentent la même part de la communauté bactérienne au cours de ces 2 campagnes. La campagne de mai 2009 représente l'une des campagnes ayant les plus fortes concentrations, tandis qu'elle représente l'une des plus faibles parts de la communauté bactérienne. Enfin, toujours pour la station **Hyères**, les concentrations en *Lpn* sont équivalentes pour les campagnes d'août et d'octobre 2007, tandis qu'elles représentent une fraction deux fois moins importante en octobre par rapport au mois d'août. La station **Albanne**, montre une baisse de la concentration de *Lpn* entre les campagnes d'août et d'octobre 2007, cette baisse n'est pas visible en termes de proportions au sein de la communauté bactérienne. La campagne de mai 2008 se distingue des autres du fait de sa concentration supérieure en *Lpn*, mais elle ne s'isole pas dans le cas de la proportion de *Lpn*. En effet, cette dernière est du même ordre de grandeur que celle des autres campagnes. Enfin, la campagne d'octobre 2008 est marquée par une forte concentration en *Lpn* mais une faible part des bactéries du biofilm.

L'estimation de la présence de *Lpn* donne donc des résultats différents en fonction du descripteur considéré. En termes de concentration de *Lpn*_{totales}, le classement des stations de la plus faible à la présence la plus importante devient :

- Savières et Plage,
- le groupe Leyse, Hyères et Albanne,
- les stations restantes : Terre Nue, Sierroz, Tillet et Aquarium.

Lorsque l'on s'intéresse à l'importance de *Lpn* dans la communauté bactérienne totale, donc à la proportion de *Lpn*_{totales}, le classement des stations devient :

- Aquarium et Savières,
- Tillet et Plage,
- Albanne
- l'ensemble des stations restantes : Sierroz, Leyse, Hyères et Terre Nue.

On retient aussi que la station Aquarium contient une forte concentration de *Lpn* mais que l'ensemble de sa communauté bactérienne est également très développée ce qui engendre une faible proportion de *Lpn* dans cette communauté. A l'inverse, la Leysse et ses affluents présentent une contamination intermédiaire en termes de concentration en *Lpn* mais sont parmi les stations où la présence de *Lpn* est la plus forte lorsque l'on considère la proportion de *Lpn*_{totales}.

Le descripteur utilisé pour caractériser et mesurer la présence de *Lpn* dans les biofilms a une influence non négligeable dans le résultat obtenu. La proportion de *Lpn* tend à identifier les stations où les *Lpn* sont favorisées par rapport aux autres espèces bactériennes.

5.4.2 Concentrations en *Lpn*_{FISH}

Les *Lpn* sont également dénombrées par la technique FISH. A partir de ces concentrations (Figure 74), leur pourcentage par rapport aux *Lpn*_{totales} et aux bactéries_{totales} est également calculé.

Les concentrations minimales, maximales et médianes rencontrées à chaque station sur l'ensemble des campagnes sont indiquées dans le Tableau 68.

Tableau 68 : Tableau récapitulatif des valeurs minimales, maximales et médianes de la concentration de *Lpn*_{FISH} par station pour l'ensemble des campagnes.

STATION	MIN		MAX		MEDIANE	
	<i>Lpn</i> /mm ²	campagne	<i>Lpn</i> /mm ²	campagne	<i>Lpn</i> /mm ²	campagne
SIERROZ	24.3	oct-07	213	juil-08	122	janv-09
AQUARIUM	24.3	janv-09	390	mars-08	170	août-07
TILLET	25.3	janv-08	371	août-07	122	mai-08
TERRE NUE	24.3	oct-07	365	mars-08	152	oct-08
HYERES	0	août-07	386	mars-08	76.1	janv-08
ALBANNE	24.3	août-07	619	oct-08	74.7	mai-09
LEYSSE	24.3	août-07	219	mai-08	97.4	janv-08
PLAGE	8.12	janv-08	110	août-07	60.9	janv-09
SAVIERES	0	juil-08	122	août-07	24.3	mai-08, oct-08, janv-09

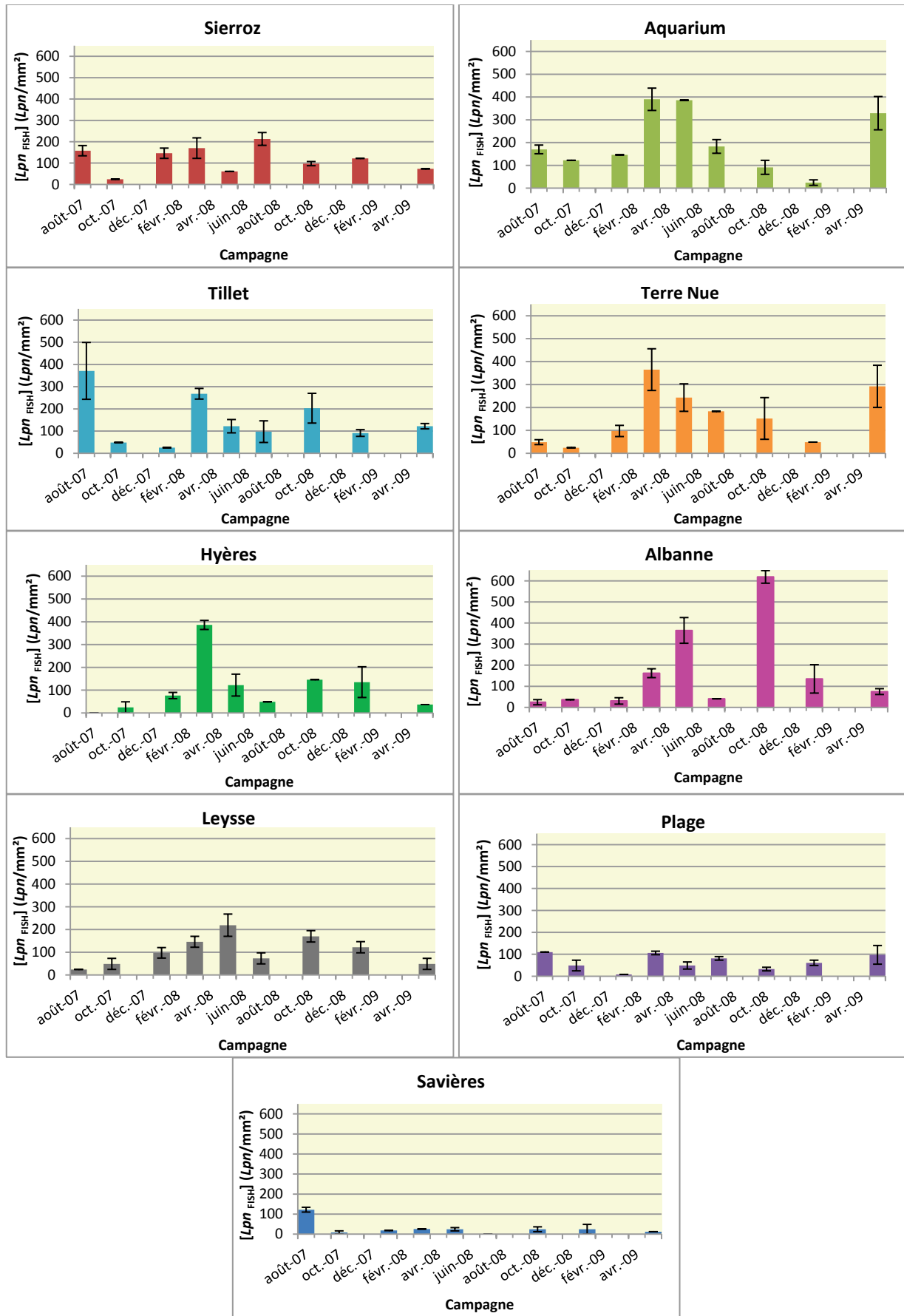


Figure 74 : Evolution de la concentration de *Lpn* dénombrées par la méthode du FISH.

Par la méthode FISH, la station **Sierroz**, compte entre 24 et 213 Lpn_{FISH}/mm^2 . Les concentrations les plus faibles sont observées lors des campagnes d'octobre ou de janvier, tandis que les plus fortes le sont en début de période estivale c'est-à-dire au cours des campagnes de mai ou de juillet.

Les biofilms de la station **Aquarium** montrent une présence plus marquée de *Lpn*, comprise entre 24 et 390 Lpn_{FISH}/mm^2 . Les concentrations les plus faibles sont observées, comme pour la station Sierroz, en début de la période hivernale (octobre ou janvier selon l'année). Les concentrations les plus fortes sont observées au printemps au cours des campagnes des mois de mars et de mai. Il semble donc qu'il existe une tendance saisonnière dans l'évolution de cette concentration.

Les concentrations retrouvées dans les biofilms de la station **Tillet** sont de même ordre de grandeur qu'à la station Aquarium, avec des valeurs comprises entre 25 et 371 Lpn_{FISH}/mm^2 . Les valeurs minimales sont observées lors des campagnes des mois de janvier 2008 et 2009, tandis que les concentrations maximales sont plus étalées tout au long du reste de l'année : en août 2007, mars, mai et octobre 2008, mai 2009.

La station **Terre Nue** présente un niveau de contamination équivalent à celui des stations Tillet et Aquarium, avec des concentrations de Lpn_{FISH} variant de 25 à 365 Lpn_{FISH}/mm^2 . Là encore les valeurs les plus faibles sont observées au début de l'hiver (octobre ou janvier) tandis que les plus fortes le sont pour les campagnes printanières (mars et mai).

La station **Leyse** présente des concentrations en Lpn_{FISH} légèrement inférieures à celles des stations précédentes. Elles vont de 25 à 220 Lpn_{FISH}/mm^2 . Contrairement à l'ensemble des autres stations les concentrations les plus faibles s'observent au cours de la période estivale août 2007, juillet 2008 et mai 2009. Les concentrations maximales sont observées lors des campagnes de mars, mai et octobre 2008. Son affluent **l'Hyères** contient des biofilms dont la concentration en *Lpn* reste inférieure à 145 Lpn/mm^2 sauf au cours de la campagne de mars 2008 où elle atteint 386 Lpn/mm^2 . Les campagnes pour lesquelles les concentrations sont les plus basses sont les mêmes que pour la Leyse. Enfin la Leyse, en amont de sa confluence avec l'Hyères (station **Albanne**) présente une concentration de *Lpn* dans ses biofilms qui est généralement inférieure à 170 Lpn/mm^2 à l'exception de deux campagnes : celle de mai 2008 où elle est de 365 Lpn/mm^2 et celle d'octobre 2008 pour laquelle elle atteint 619 Lpn/mm^2 .

Lpn_{FISH} est peu présente au niveau de la station **Plage**, la concentration est comprise entre 8 et 110 Lpn_{FISH}/mm^2 . La concentration la plus faible est observée lors de la campagne de janvier 2008, tandis que la plus importante l'est en mars 2008. En 2009, la concentration maximale de *Lpn* est également observée en période printanière, car elle est obtenue au cours du mois de mai.

La station **Savières** est la moins chargée en Lpn_{FISH} . Ses concentrations restent inférieures à 26 Lpn_{FISH}/mm^2 sauf au cours de la première campagne où elle atteint 122 Lpn_{FISH}/mm^2 . Leur concentration est même inférieure au seuil de détection au cours de la campagne de juillet 2008.

Comme cette mesure est censée tenir compte de l'activité des *Lpn*, le premier rapport calculé est donc le rapport $Lpn_{FISH}/Lpn_{totales}$ qui doit rendre compte de l'état d'activité globale de la communauté de *Lpn* des biofilms échantillonnés (Figure 75 et Tableau 77).

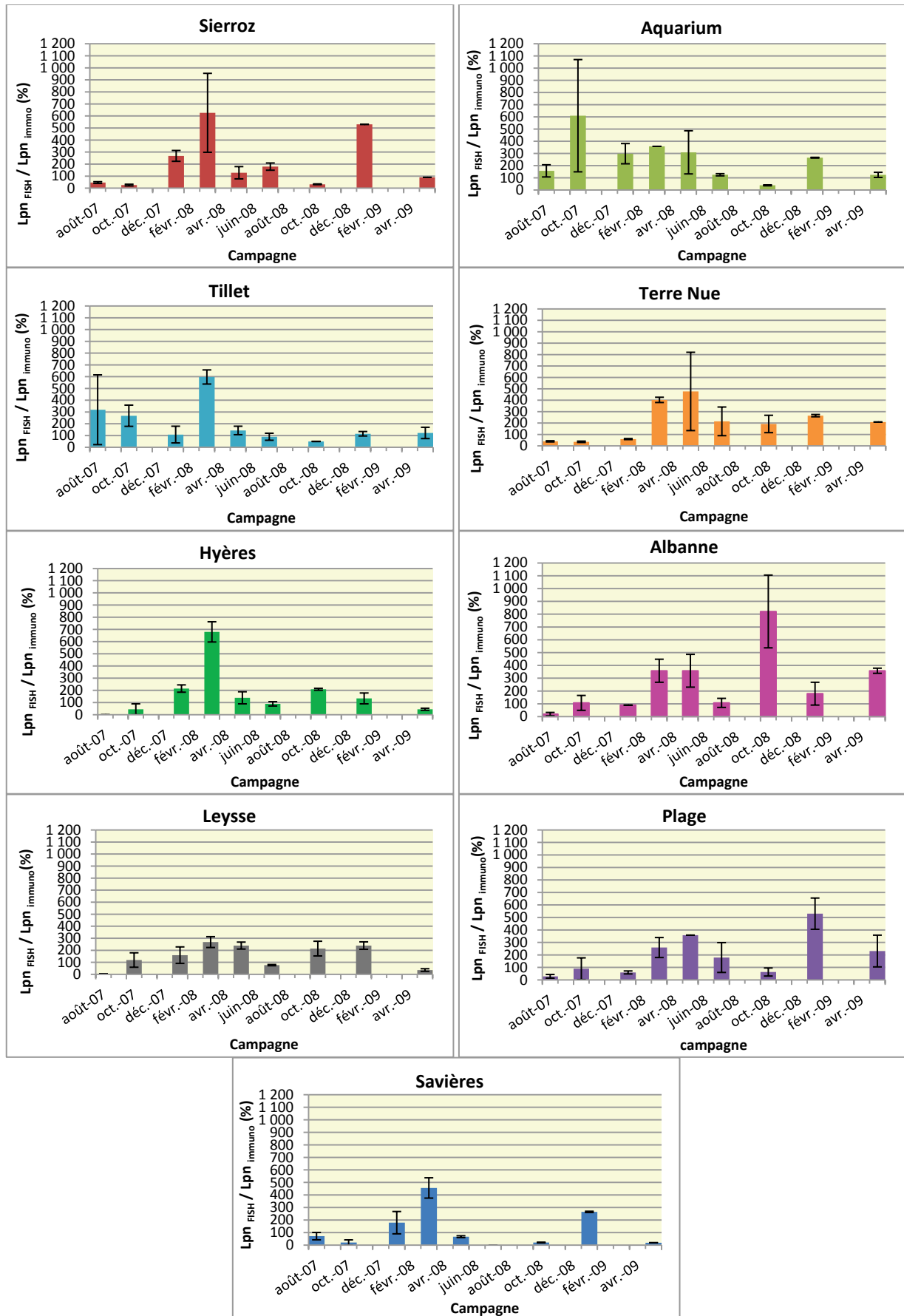


Figure 75 : Proportion des *Lpn*_{totales} marquées par la méthode FISH ($Lpn_{FISH}/Lpn_{totales}$).

Tableau 69 : Tableau récapitulatif des valeurs minimales, maximales et médianes de la proportion de *Lpn*_{FISH} par station pour l'ensemble des campagnes.

STATION	MIN		MAX		MEDIANE	
	% <i>Lpn</i>	campagne	% <i>Lpn</i>	campagne	% <i>Lpn</i>	campagne
SIERROZ	25.6	oct-07	626	mars-08	128	mai-08
AQUARIUM	38.4	oct-08	609.5	oct-07	265	janv-09
TILLET	49.7	oct-08	597	mars-08	122	mai-09
TERRE NUE	35.8	oct-07	477	mai-08	209	mai-09
HYERES	0	août-07	680	mars-08	134	janv-09
ALBANNE	19.2	août-07	821	oct-08	179	janv-09
LEYSSE	3.65	août-07	268	mars-08	159.5	janv-08
PLAGE	28.8	août-07	530	janv-09	179	juil-08
SAVIERES	0	juil-08	456	mars-08	67.1	mai-08

On remarque que le rapport $Lpn_{FISH}/Lpn_{totales}$ est, dans la grande majorité des cas, très supérieur à la valeur de 100%. Seule la station **Savières** semble faire exception, avec seulement 3 campagnes supérieures à 100%. Les stations **Aquarium**, **Terre Nue**, **Leyse** et **Albanne**, ne présentent presque que des rapports supérieurs à 100%. Enfin, pour les stations restantes, c'est-à-dire **Sierroz**, **Plage**, **Tillet** et **Hyères**, on compte presque autant de campagnes avec un rapport supérieur à 100%, que de campagnes avec un rapport inférieur.

Les valeurs maximales sont observées au cours de la campagne de mars 2008 pour la majorité des stations (Savières, Sierroz, Tillet, Leyse et Hyères), mais aussi en mai 2008 pour la station Terre Nue, en janvier 2009 pour Plage, octobre 2007 à Aquarium et octobre 2008 à Albanne. Cette dernière représente la valeur la plus forte, toutes stations et toutes campagnes confondues. A l'inverse, les rapports les plus faibles sont obtenus au cours des campagnes des mois d'octobre 2007 (Sierroz : 25%, Terre Nue : 36%) ou 2008 (Aquarium : 38%, Tillet : 50%), d'août 2007 (Plage : 29% ; Leyse : 4% ; Hyères : 0% ; Albanne : 19%), ou encore en juillet 2008 (Savières : 0%).

Les très fortes valeurs observées pour ce rapport peuvent s'expliquer de plusieurs manières :

- Un marquage des $Lpn_{totales}$ par le kit immunofluorescent qui ne marquerait pas l'ensemble des sérogroupes de *Lpn*
- Un problème de spécificité de la sonde Legpne1 utilisée en FISH.

La sonde Legpne1 a tout d'abord été décrite comme ne marquant que les sérogroupes 1,3,4 et 6 (Grimm *et al.*, 1998). Une étude plus récente montre qu'elle s'hybride également aux sérogroupes 2, 8, 9, 10, 11 et 13 de *Lpn*, mais aussi que les hybridations avec des *Legionella* spp semblent fréquentes, parmi elles, certains sérogroupes des espèces *L. micdadei*, *L. dumoffi*, *L. gormanii*, *L. bozemanii*, *L. feeleii*, *L. jordanis*, *L. israelensis*... (Willks and Keevil, 2006). Il existe également une sonde PNA (Peptid Nucleic Acid) : la sonde PLPNE620, dont la séquence reprend les 15 dernières bases de la sonde Legpne1. Cette sonde PLPNE620 s'hybride à tous les sérogroupes de *Lpn* et à seulement deux autres espèces de légionelles non pneumophila. Ces sondes PNA permettent d'effectuer l'hybridation dans des conditions moins rigoureuses que les sondes ADN (Willks and Keevil, 2006). Mais en raison du coût de la sonde PLPNE620 et des résultats obtenus au cours des premières campagnes, nous avons choisi de conserver la méthode FISH ainsi que la sonde Legpne1.

Les valeurs légèrement supérieures à 100% peuvent, elles, s'expliquer par les erreurs dues aux comptages en cas d'échantillons peu homogènes ou de la présence de particules gênant lors des dénombrements.

5.4.3 Concentrations de *Lpn*_{cultivables}

Les *Lpn* sont peu présentes à l'état cultivable dans les biofilms naturels à l'exception de la station **Aquarium**. A quelques autres stations seulement, quelques colonies peuvent être observées de manière ponctuelle. D'une manière générale, leurs concentrations restent très faibles avec moins d'1 UFC/mm² de biofilm (Tableau 70).

Tableau 70 : Tableau de synthèse des concentrations en *Lpn*_{cultivables}.

Station	Campagne	<i>Lpn</i> _{cultivables} (UFC/mm ²)	CV (%)	<i>Lpn</i> cultivables / Bactéries cultivables (%)	<i>Lpn</i> cultivables/ <i>Lpn</i> totales (%)	Sérogroupe présents
Aquarium	Août 2007	3.16 x10 ⁻¹	80	0.037	0.388	1/9/2-14
	Octobre 2007	6 x10 ⁻³	0	0.004	0.027	1/9/2-14
	Mai 2008	3.2 x10 ⁻²	59	0.004	0.04	1
	Juillet 2008	9.49 x10 ⁻¹	13	0.041	0.698	1/9/2-14
	Octobre 2008	3.80	33	0.072	1.2	1/ 2-14
	Mai 2009	1.27	0	0.027	0.478	1/ 2-14
Terre Nue	Janvier 2009	6.33 x10 ⁻¹	100	0.027	3.44	2-14
Albanne	Mai 2008	1.9 x10 ⁻²	100	0.001	0.037	9/2-14
Leyse	Octobre 2008	6 x10 ⁻³	0	0.002	0.014	1/ 2-14
Plage	Mai 2008	6 x10 ⁻³	0	0.012	0.014	1

Il est important de remarquer que dans presque tous les cas où l'on retrouve des *Lpn* à l'état cultivable, des colonies de *Lpn* du sérogroupe 1 sont présentes. Le sérogroupe 9 est identifié lorsque la réaction d'agglutination est positive à la fois avec le réactif sérogroupe 1 et avec le réactif sérogroupe 2-14 (notice kit agglutination Oxoid).

Dans de nombreux échantillons, le développement d'une flore annexe importante peut conduire à la sous-estimation de la concentration en *Lpn*_{cultivables}. Cette sous-estimation peut provenir soit de la présence de colonies inhibant la croissance de *Lpn*, soit de l'absence de zones non-colonisées par les autres espèces à développement plus rapide, soit d'un masquage des colonies de *Lpn* par la flore annexe.

Les *Lpn*_{cultivables} sont plutôt rares dans nos biofilms naturels. Les *Lpn*_{cultivables} représentent toujours moins de 0.1% des bactéries cultivables totales. Dans quasiment tous les cas, moins de 1% des *Lpn* sont présentes dans les biofilms dans un état cultivable (*Lpn*_{cultivables}/*Lpn*_{totales}). Les deux valeurs maximales sont de 1.2% et de 3.44% observées respectivement à la station Aquarium en octobre 2008 et à la station Terre Nue en janvier 2009. D'une manière générale, la station contenant le plus de *Lpn*_{cultivables} reste la station Aquarium.

Les conditions des biofilms permettent donc aux *Lpn* de trouver un environnement favorable à leur développement, mais ces conditions ne suffisent pas à la présence d'une communauté de *Lpn*_{cultivables}. Ces résultats mettent bien en évidence le fait que les techniques normalisées de dénombrement des *Lpn* par culture ne suffisent pas à les dénombrer efficacement dans des environnements naturels.

5.5 Recherche de corrélations entre les concentrations en *Lpn* et les autres descripteurs du biofilm

Une recherche de corrélations entre les différents descripteurs de l'espèce *Lpn* (concentrations, proportions) et les autres descripteurs des biofilms (Tableau 71) est tout d'abord effectuée sur l'ensemble des stations (τ de Kendall avec $\alpha=5\%$; Annexe 1). Des corrélations statistiquement significatives sont obtenues, mais elles restent inférieures à -0.40 ce qui est assez faible.

Tableau 71 : Liste des descripteurs utilisés dans la recherche de corrélations entre les différentes formes de *Lpn* et les autres descripteurs du biofilms.

Descripteurs des différentes formes de <i>Lpn</i>	Autres descripteurs du biofilm
<i>Lpn</i> _{totales}	Bactéries _{totales}
<i>Lpn</i> _{cultivables}	Bactéries _{cultivables}
<i>Lpn</i> _{FISH}	Flagellés (pigmentés, non pigmentés, totaux)
<i>Lpn</i> _{cultivables} / Bactéries _{cultivables}	Amibes
<i>Lpn</i> _{totales} / Bactéries _{totales}	Ciliés
<i>Lpn</i> _{FISH} / Bactéries _{totales}	Protistes
<i>Lpn</i> _{FISH} / <i>Lpn</i> _{totales}	Poids sec du biofilm
<i>Lpn</i> _{cultivables} / <i>Lpn</i> _{FISH}	Matière organique du biofilm
<i>Lpn</i> _{cultivables} / <i>Lpn</i> _{totales}	Bactéries _{cultivables} / Bactéries _{totales}
<i>Lpn</i> _{totales} / amibes	Matière organique biofilm / Poids sec
<i>Lpn</i> _{FISH} / amibes	Bactéries _{totales} / amibes
	Flagellés pigmentés / Flagellés totaux
	Flagellés / Bactéries _{totales}
	Flagellés / Bactéries _{cultivables}
	Bactéries _{cultivables} / amibes

Le regroupement de certaines stations évoqué dans la conclusion sur les effets des paramètres environnementaux sur le développement des biofilms (chapitre 0) a donc ensuite été utilisé. Différents regroupements ont été testés, les groupes finalement sélectionnés sont les suivants :

- La station Aquarium seule
- Les stations Savières et Plage
- Les stations de la Leysse (Leysse, Hyères et Albanne)
- Les stations Sierroz et Tillet
- La station Terre Nue.

Parmi les corrélations statistiquement significatives obtenues par le calcul du τ de Kendall, seules sont conservées les corrélations présentant une tendance nette (Tableau 72).

Tableau 72 : Corrélations significatives entre les descripteurs de la communauté de *Lpn* et les autres descripteurs biologiques des biofilms par groupe de stations.

	Corrélations positives	Corrélations Négatives
Aquarium (n=9)	$Lpn_{\text{totales}} - \text{Bactéries}_{\text{cultivables}}$ $Lpn_{\text{FISH}} - \text{"Bactéries}_{\text{cultivables}} / \text{amibes"}$ $Lpn_{\text{FISH}} - \text{"Bactéries}_{\text{totales}} / \text{amibes"}$ $\text{"Lpn}_{\text{cultivables}} / \text{Bactéries}_{\text{cultivables}} - \text{Poids sec}$	$\text{"Lpn}_{\text{FISH}} / Lpn_{\text{totales}} - \text{Bactéries}_{\text{cultivables}}$
Savières – Plage (n=18)	$Lpn_{\text{FISH}} - \text{Bactéries}_{\text{totales}}$ $Lpn_{\text{FISH}} - \text{Protistes}$ $Lpn_{\text{FISH}} - \text{Ciliés}$	
Leyse – Hyères – Albanne (n=27)	$Lpn_{\text{totales}} - \text{bactéries}_{\text{cultivables}}$	
Sierroz – Tillet (n=18)		$\text{"Lpn}_{\text{totales}} / \text{amibes" - Bactéries}_{\text{totales}}$
Terre Nue (n=9)		$Lpn_{\text{FISH}} - \text{"Flagellés} / \text{Bactéries}_{\text{totales}}"$

Il existe peu de corrélations entre les différents descripteurs des *Lpn* dans les biofilms et les autres descripteurs biologiques des biofilms. Pour la station Aquarium, et les stations de la Leyse, on note toutefois que les facteurs favorables aux *Lpn* sont également favorables aux bactéries_{cultivables} (Figure 76). Egalement pour la station Aquarium, plus le biofilm se développe en termes de poids sec, plus *Lpn* représente une fraction importante des bactéries_{cultivables} de ces biofilms. Enfin, le plus grand nombre de corrélations concerne les *Lpn* dénombrées par la technique FISH, souvent avec les bactéries_{totales}, ce qui va dans le sens d'un problème de spécificité de la sonde utilisée.

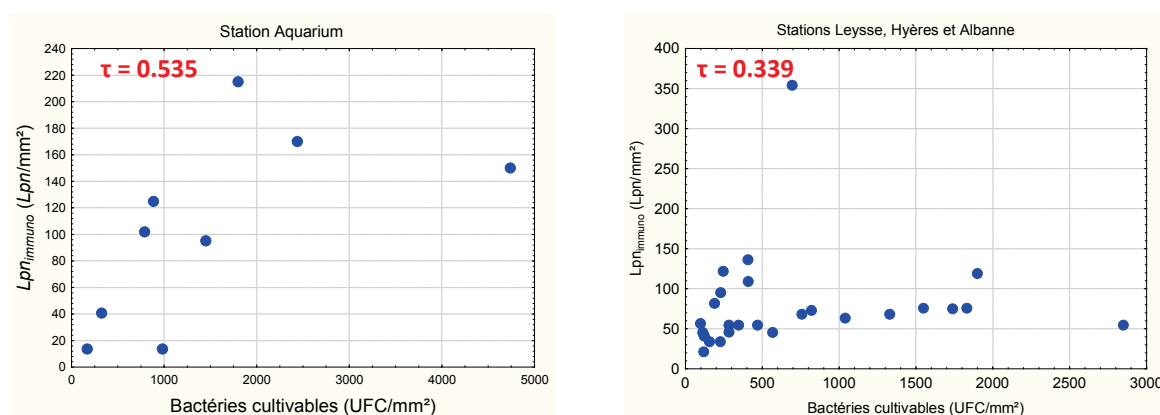


Figure 76 : Concentrations en *Lpn*_{totales} en fonction de la concentration en bactéries_{cultivables} pour les biofilms de la station Aquarium (n=9) et du groupe de stations Leyse, Hyères et Albanne (n=27). Le τ est le coefficient de corrélation de Kendall, il est en rouge lorsqu'il est significatif ($p \leq 0.05$).

Comme peu de corrélations impliquent des *Lpn*, il est probable que cette espèce soit contrôlée par des facteurs spécifiques ou soit présente dans des conditions bien spécifiques. La corrélation avec les bactéries_{cultivables} pour certaines stations indique qu'il peut s'agir des mêmes facteurs que ceux favorisant l'état cultivable dans les biofilms.

Cette quasi-absence de corrélations est en accord avec des données obtenues lors d'études sur des réseaux domestiques ou hospitalier où il n'a pas été observé de corrélation entre les concentrations en *Lpn* et les concentrations en bactéries_{totales} ou les *Pseudomonas* (Leoni, *et al.*, 2005). Une étude sur des eaux souterraines montre également l'absence de relation entre la présence de légionelles dans l'eau ou dans les biofilms et les autres descripteurs bactériologiques (Brooks, *et al.*, 2004).

5.6 Recherche de corrélations entre les concentrations en *Lpn* et les descripteurs physico-chimiques

A la vue du petit nombre de corrélations qui existent entre les *Lpn* et les autres composants du biofilm, il est plus probable que cette espèce soit principalement contrôlée par des paramètres physico-chimiques caractérisant le milieu dans le développement des biofilms.

Comme précédemment, le calcul des corrélations est d'abord effectué sur l'ensemble des stations, mais là encore, lorsque les coefficients de corrélation sont significatifs, leurs valeurs restent faibles, inférieures à 0.45 (Annexe 1 et Annexe 2).

Les groupes de stations précédents sont donc ensuite utilisés pour la recherche de corrélations. Comme dans le paragraphe précédent, seuls les corrélations significatives, présentant une tendance visuelle nette sont ensuite conservées (Tableau 73).

Tableau 73 : corrélations entre les descripteurs des *Lpn* et les descripteurs de l'environnement obtenues par groupes de stations.

Station	Corrélations positives	Corrélations négatives
Aquarium (n=9)	<i>Lpn</i> _{cultivables} – Température <i>Lpn</i> _{totales} – Température " <i>Lpn</i> _{cultivables} / <i>Lpn</i> _{totales} " – Température " <i>Lpn</i> _{cultivables} / <i>Lpn</i> _{FISH} " – Température " <i>Lpn</i> _{cultivables} / Bactéries _{cultivables} " – Température <i>Lpn</i> _{FISH} – pH " <i>Lpn</i> _{FISH} / Bactéries _{totales} " – pH " <i>Lpn</i> _{FISH} / Bactéries _{totales} " – Potassium " <i>Lpn</i> _{cultivables} / Bactéries _{cultivables} " – Calcium <i>Lpn</i> _{totales} – Calcium " <i>Lpn</i> _{totales} / Amibes" – Débit d'incubation	" <i>Lpn</i> _{totales} / Bactéries _{totales} " – Conductivité " <i>Lpn</i> _{totales} / amibes" – Sodium
Savières – Plage (n=18)	<i>Lpn</i> _{totales} – Température	<i>Lpn</i> _{totales} – Nitrates " <i>Lpn</i> _{totales} / Bactéries _{totales} " – Nitrates " <i>Lpn</i> _{totales} / Amibes" – Nitrates <i>Lpn</i> _{totales} – Conductivité " <i>Lpn</i> _{totales} / Bactéries _{totales} " – Conductivité " <i>Lpn</i> _{totales} / Bactéries _{totales} " – Phosphates " <i>Lpn</i> _{FISH} / amibes" – Calcium
Leyse – Hyères – Albanne (n=27)	" <i>Lpn</i> _{totales} / Amibes" – Débit de pré-incubation + Incubation " <i>Lpn</i> _{totales} / Amibes" – Débit incubation " <i>Lpn</i> _{totales} / Amibes" – Conductivité " <i>Lpn</i> _{FISH} / Bactéries _{totales} " – Chlorures	<i>Lpn</i> _{FISH} / Amibes – Débit incubation <i>Lpn</i> _{totales} – Phosphates
Sierroz- Tillet (n=18)	<i>Lpn</i> _{totales} – Température " <i>Lpn</i> _{totales} / Bactéries _{totales} " – Température " <i>Lpn</i> _{totales} / Bactéries _{totales} " – Potassium	" <i>Lpn</i> _{FISH} / Amibes" – Magnésium
Terre Nue (n=9)		<i>Lpn</i> _{FISH} – COD " <i>Lpn</i> _{FISH} / Amibes" – COD <i>Lpn</i> _{FISH} – Potassium " <i>Lpn</i> _{FISH} / Amibes" – Potassium " <i>Lpn</i> _{FISH} / Bactéries _{totales} " – Potassium " <i>Lpn</i> _{FISH} / Bactéries _{totales} " – Magnésium <i>Lpn</i> _{totales} – Sulfates <i>Lpn</i> _{totales} – Chlorures

On peut remarquer que certaines corrélations reviennent dans plusieurs groupes de stations. C'est le cas de la corrélation entre les concentrations en *Lpn*_{totales} et la température de l'eau (température lors du prélèvement d'eau en vue des analyses chimiques). En effet, cette corrélation se retrouve aux stations Sierroz-Tillet, Savières – Plage et à la station Aquarium où l'on remarque également une corrélation entre la température et les concentrations en *Lpn*_{cultivables} ou avec les proportions de *Lpn*_{cultivables} (Figure 77).

Certaines espèces ioniques présentent des corrélations avec les descripteurs des légionelles, mais ces corrélations sont très localisées, souvent limitées à un seul groupe de stations. Les ions pouvant localement favoriser les *Lpn* sont : le calcium et le potassium, tandis que les ions potentiellement inhibiteurs sont le sodium, les nitrates, les phosphates, les sulfates, les chlorures, le calcium, le magnésium et le potassium. On notera que les ions calcium et potassium présentent un effet opposé dans deux groupes de stations.

Les débits peuvent localement influencer les *Lpn*, et plus particulièrement le rapport entre les *Lpn*_{totales} et les amibes. En effet, aux stations du groupe Leysse, Hyères, Albanne et à la station Aquarium, l'augmentation de débit favorise *Lpn* par rapport aux amibes. A plus fort débit, *Lpn* peut utiliser les amibes afin de mieux se maintenir sur le substrat, elles effectuent une multiplication intracellulaire avant de lyser l'amibe, engendrant à la fois une augmentation de la concentration de *Lpn* et une baisse de celle des amibes.

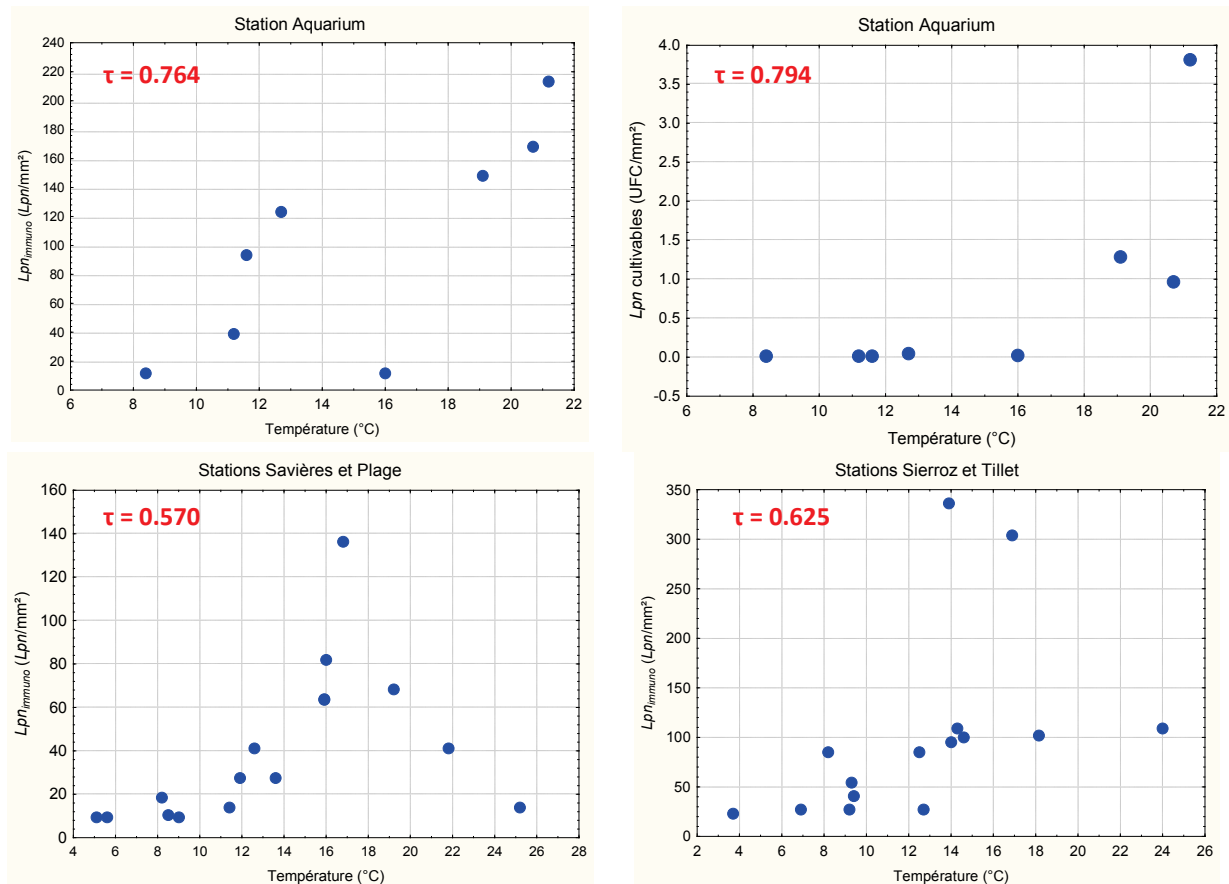


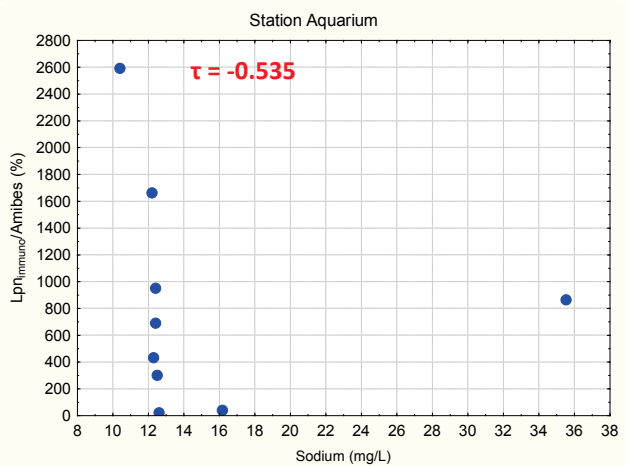
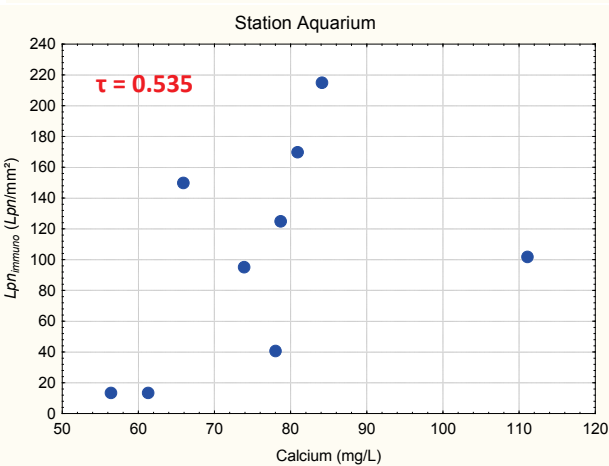
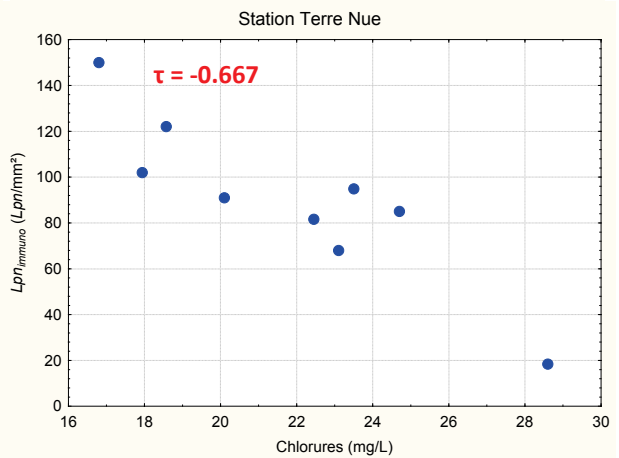
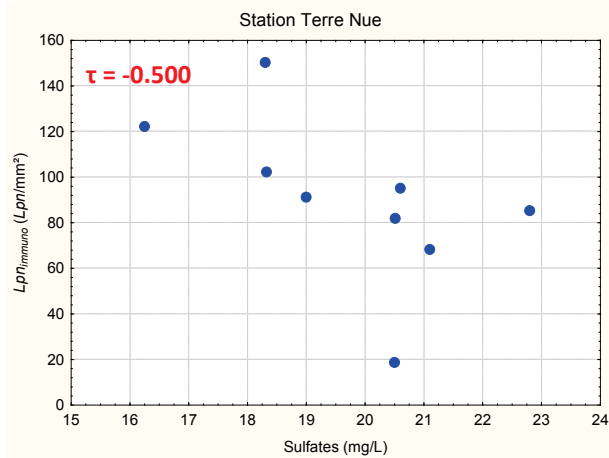
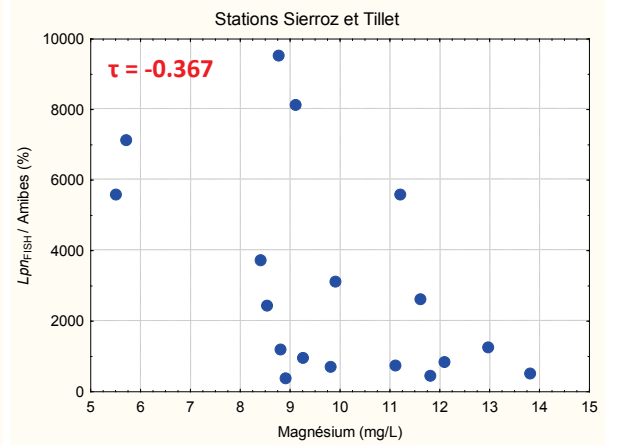
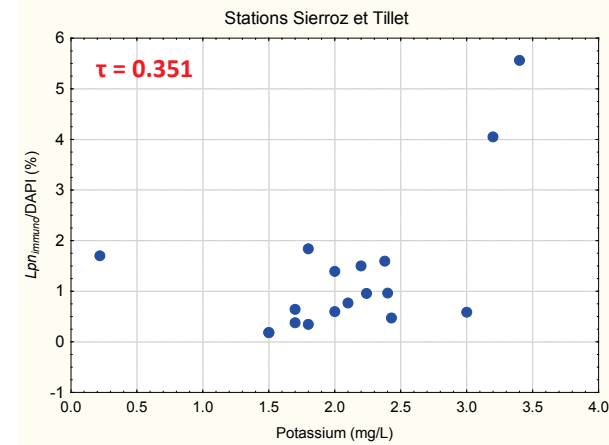
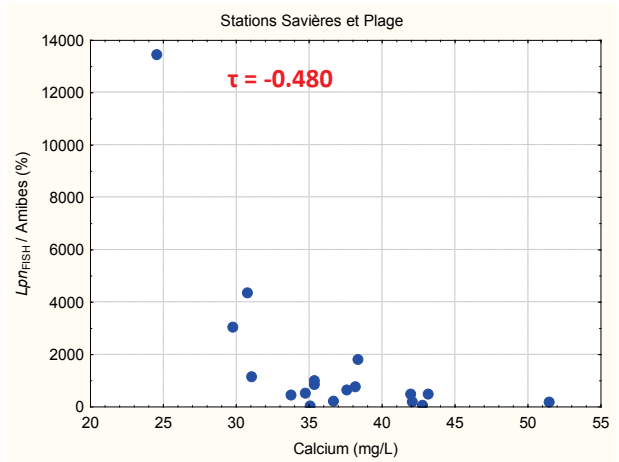
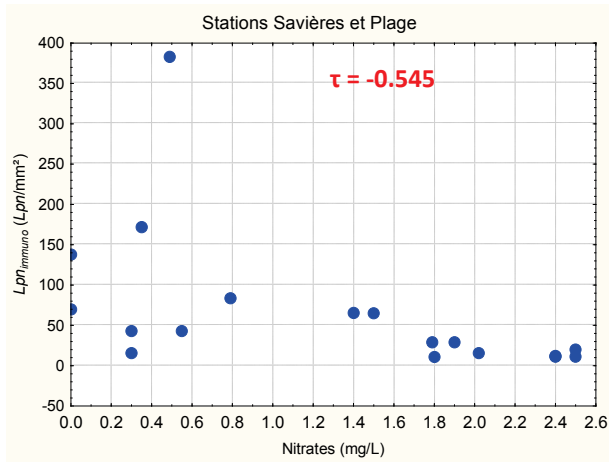
Figure 77 : Concentrations en *Lpn* totales ou cultivables en fonction de la température de l'eau pour différents groupes de stations (n=9 à 18). Le τ est le coefficient de corrélation de Kendall, il est en rouge lorsqu'il est significatif ($p \leq 0.05$).

A la station Aquarium, on remarque qu'une température supérieure est nécessaire pour favoriser les $Lpn_{\text{cultivables}}$ par rapport aux Lpn_{totales} . En dessous d'une eau à 16°C, les colonies de *Lpn* sont extrêmement rares dans nos biofilms. Au niveau des stations Savières et Plage, la concentration de Lpn_{totales} commence à augmenter à partir d'une température de 10°C, puis au-dessus de 17°C les concentrations en Lpn_{totales} diminuent jusqu'à des températures de 28°C. Pour les stations Sierroz et Tillet la concentration en Lpn_{totales} augmente jusqu'à une température de 24°C, mais avec deux ruptures de pentes, la première vers 7°C et la seconde vers 14°C. C'est la partie centrale qui présente la plus forte pente, donc l'effet le plus marqué de la température.

Au niveau de la station Aquarium, on remarque que la corrélation entre les Lpn_{totales} et la température est plutôt du type linéaire, tandis que la corrélation entre les $Lpn_{\text{cultivables}}$ et la température est du type exponentielle, avec une concentration nulle ou proche de 0 UFC/mm² jusqu'à une température de 16°C où elle commence à augmenter de manière visible jusqu'à une température de 19°C environ.

Comme cela a été précisé précédemment, l'évolution des descripteurs en fonction des concentrations ioniques est assez spécifique à chaque groupe de station (Figure 78), avec dans certains cas un effet opposé de la même espèce ionique entre deux groupes.

5. Distribution de *Lpn* dans les biofilms des affluents du lac du Bourget.



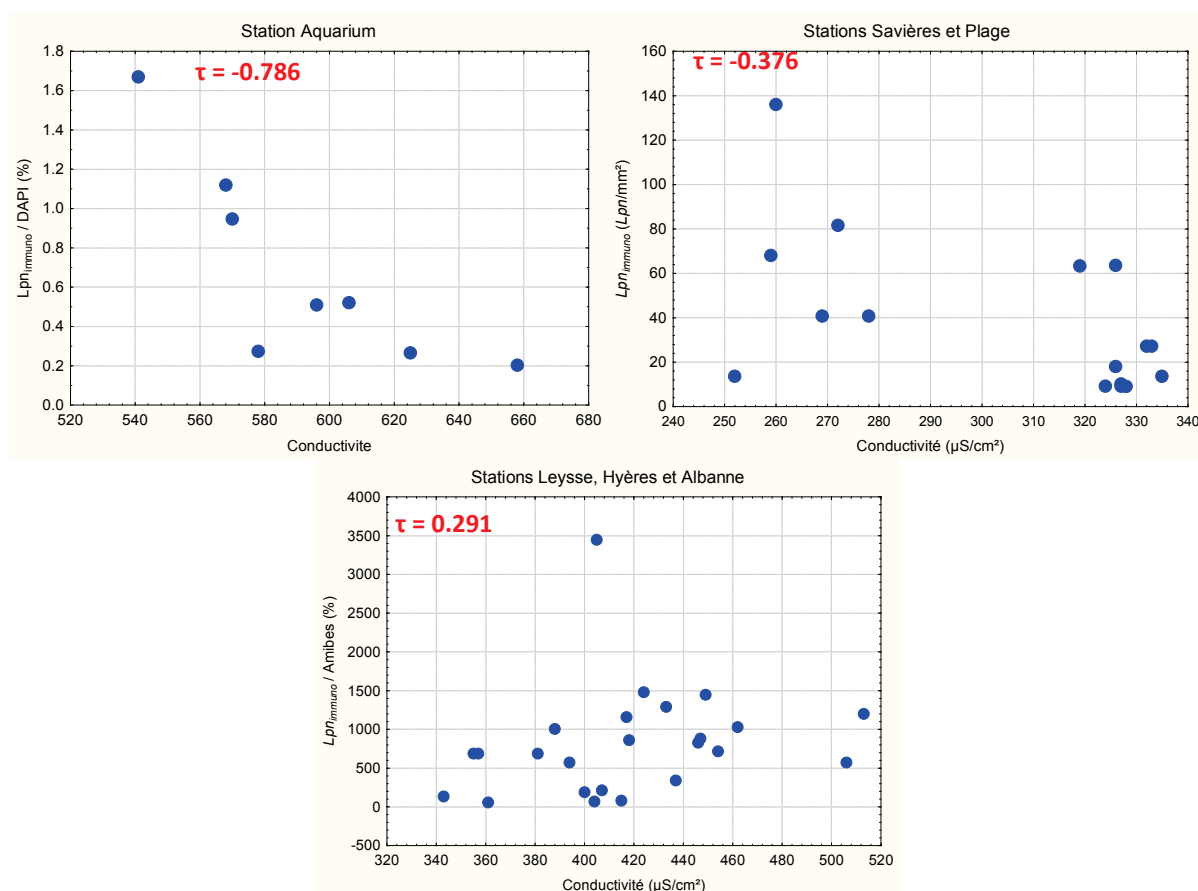


Figure 78 : Représentation des principales corrélations existantes entre les *Lpn* et les descripteurs physico-chimiques pour chaque groupe de stations (n=9 à 27). Le τ est le coefficient de corrélation de Kendall, il est en rouge lorsqu'il est significatif ($p \leq 0.05$).

Les ions pouvant localement favoriser les *Lpn* sont : le calcium et le potassium, tandis que les ions potentiellement inhibiteurs sont le sodium, les nitrates, les phosphates, les sulfates, les chlorures, le calcium, le magnésium et le potassium. On notera que les ions calcium et potassium présentent un effet opposé dans deux groupes de stations.

Afin de compléter ces résultats, la recherche de corrélations entre les descripteurs environnementaux et les *Lpn* a également été effectuée par station. Les principales corrélations observées sont les mêmes que celles obtenues pour les groupes de stations, mais d'autres corrélations avec les différentes espèces ioniques peuvent apparaître d'une manière encore plus locale. C'est le cas, entre les concentrations ou les proportions en $Lpn_{totales}$ et les concentrations en potassium au niveau des stations Savières et Hyères. Mais aussi entre les concentrations en $Lpn_{totales}$ et les concentrations en sulfates pour la station Tillet ou encore entre la proportion de $Lpn_{totales}$ et la concentration en nitrates à la station Hyères (Figure 79).

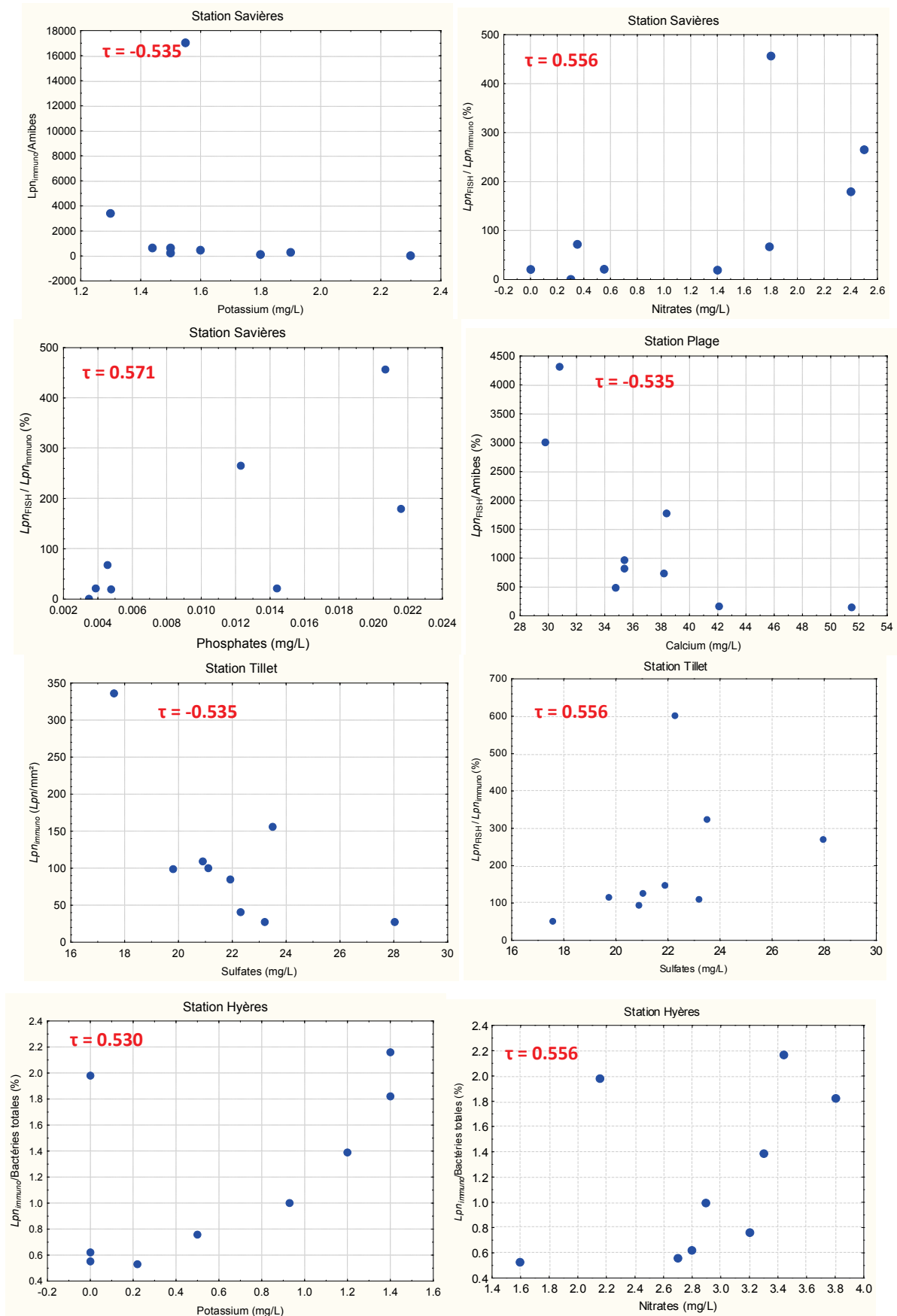


Figure 79: Corrélations entre les Lpn et les espèces ioniques restreintes à des stations considérées individuellement (n=8 à 9). Le τ est le coefficient de corrélation de Kendall, il est en rouge lorsqu'il est significatif ($p \leq 0.05$).

Certaines espèces ioniques ont un effet opposé sur les concentrations ou les proportions de *Lpn*. C'est le cas des nitrates qui inhibent les *Lpn*_{totales} à la station Savières tandis qu'ils stimulent la proportion de *Lpn*_{totales} à la station Hyères. Il faut toutefois noter que pour ces deux stations la gamme de concentration en nitrates rencontrée est différente (concentrations médianes en nitrates de 2.89 mg/L sur l'Hyères et de 1.4 mg/L à Savières). L'augmentation de la concentration en potassium va se traduire par une baisse de la proportion des *Lpn*_{totales} des biofilms de la station Savières, tandis que les *Lpn*_{totales} seront stimulées par rapport aux bactéries_{totales} dans le cas de deux autres stations : Sierroz et Hyères. La gamme de concentration rencontrée est du même ordre pour les stations Savières et Sierroz (1.55 et 2.1 mg/L), mais inférieure pour la station Hyères (0.012 mg/L). Enfin, d'autres espèces ioniques peuvent être importantes. Les chlorures inhibent les *Lpn* à la station Terre Nue tout comme les sulfates inhibent les *Lpn*_{totales} à la station Tillet, provoquant ainsi une augmentation du rapport *Lpn*_{FISH} / *Lpn*_{totales}. A la station Plage, les concentrations en calcium correspondent à une baisse du rapport entre les *Lpn*_{FISH} et les amibes. Il est possible que ces ions jouent un rôle dans le processus de multiplication intra-amibienne. Enfin, à la station Savières les concentrations en phosphates sont positivement corrélées au rapport *Lpn*_{FISH}/*Lpn*_{totales}.

Plusieurs hypothèses sont possibles, soit les concentrations ioniques « contrôlent » les concentrations et les proportions de *Lpn* dans ces différents cas. Mais il est également possible qu'un autre facteur externe agisse simultanément sur les concentrations en *Lpn* et sur les concentrations ioniques. Les différents descripteurs que nous avons choisis de suivre ne nous permettent pas d'identifier ce facteur si tel est le cas.

Dans des réseaux d'eau domestique, hôtelier et hospitalier, il a été montré que les concentrations en *Legionella spp* et en *Lpn* sont corrélées négativement aux concentrations en cuivre, calcium et magnésium et positivement avec le pH et le carbone organique total (Leoni, *et al.*, 2005). Il s'agit là d'une étude sur les *Lpn* de la colonne d'eau et non des biofilms ce qui peut expliquer les différences avec nos résultats, en particulier concernant le calcium. De plus, le type de milieu ambiant est également différent, car il s'agit dans notre cas de rivières et non pas de réseau domestique. Au cours de cette étude sur ces réseaux, il n'est pas trouvé de corrélation significative avec la température de l'eau, mais l'eau était à des températures plus élevées (~50°C) que dans le cas des rivières.

D'une manière générale, les concentrations en ions métalliques inférieures à 10 mg/L n'ont pas d'influence sur la culture de *Lpn*. Les ions fer et zinc, en très faibles concentrations (0.5 et 1 mg/L) présentent toutefois un effet stimulateur sur les *Lpn*_{cultivables} tout comme de plus fortes concentrations en potassium (entre 1 et 100 mg/L) (States, *et al.*, 1985). Cet effet stimulateur du potassium est retrouvé localement, sur les concentrations et les proportions de *Lpn*_{totales} pour le groupe de stations Sierroz et Tillet, et les stations Sierroz et Hyères, lorsque les stations sont considérées individuellement. Par contre, il est difficile d'expliquer de quelle manière cet effet stimulateur va s'effectuer.

5.7 Conclusions sur la présence de *Lpn* dans les biofilms des affluents du lac du Bourget

A partir de ces résultats nous pouvons montrer que les *Lpn* sont présentes de manière naturelle dans les biofilms des affluents du Lac de Bourget. Malgré cela, leur présence concerne principalement un état VBNC, donc non identifiable à travers les techniques classiques d'analyse d'eau. Seule la station située dans la partie aval du réseau aixois montre une occurrence supérieure en termes de concentrations de *Lpn*, mais c'est également la seule station avec une présence quasi-permanente de *Lpn*_{cultivables}. Cet état plus cultivable peut provenir des souches de *Lpn* elles-mêmes (issues des eaux thermales) ou d'un milieu plus favorable à cet état, en particulier à travers une température d'eau plus élevée, une vitesse de l'eau plus importante ou une absence de lumière.

D'une manière générale, les facteurs de contrôles potentiels de cette bactérie dans les biofilms semblent spécifiques aux différentes stations étudiées. Cependant, le facteur favorisant son développement dans près de la moitié de nos stations est le facteur température de l'eau. Les débits ne semblent pas influencer de manière significative la présence de *Lpn* dans les biofilms de la plupart des stations suivies. Que ce soit à travers l'étude des cinétiques des différents descripteurs des *Lpn* ou des différentes corrélations obtenues sur les 3 stations situées sur la Leysse et ses affluents, il n'est pas possible de mettre en évidence les effets des apports potentiels lors du lessivage du site de la station d'épuration de Chambéry sur les *Lpn* des biofilms situées à l'aval de ce site.

Les autres descripteurs du biofilm suivis au cours de cette étude ne permettent pas, non plus, de mettre en évidence un groupe d'organismes tel que les amibes en tant de facteur de régulation des *Lpn* dans les biofilms environnementaux. Des résultats pourraient être obtenus grâce à des suivis plus approfondis des communautés composant les biofilms (espèces bactériennes ou protistes). Mais ceci n'a pu être effectué dans le cadre de cet inventaire car les techniques d'électrophorèses sur gel ne permettent d'obtenir des résultats que dans des cas de diversité restreinte ; et les marquages FISH de groupes spécifiques (eubactéries, α, β, γ ou δ protéobactéries, Cytophaga...) n'ont pas pu être utilisés en raison du temps demandé pour effectuer ces analyses sur l'ensemble de nos échantillons. Seule une comparaison basée sur l'analyse des séquences aurait pu donner une indication plus précise des changements de diversité avec le risque de ne pas pouvoir identifier les espèces correspondant aux séquences qui présentent de fortes modifications entre les stations ou entre les campagnes.

L'utilisation de la technique de PCR quantitative a également été testée pour ce volet, mais, la présence d'inhibiteur de la PCR dans un grand nombre d'échantillons (15%) ainsi qu'un seuil de quantification trop élevé pour nos échantillons ne nous permet pas d'utiliser ces résultats. Plusieurs études s'accordent sur ce sujet (Toze, 1999, Riffard, *et al.*, 2001, Levi, *et al.*, 2003), tout comme l'étude de Brooks *et al.* en 2004 qui retrouve des inhibiteurs de PCR dans 20% des échantillons d'eau souterraines et de biofilms.

La spécificité géographique de l'ensemble des facteurs pouvant potentiellement expliquer les variations de l'occurrence de *Lpn* dans les biofilms ne permet pas de les considérer comme des facteurs naturels de régulation des *Lpn* dans les biofilms. Par conséquent, si des *Lpn* sont apportées en concentrations importantes (perturbation d'origine anthropique par exemple) dans un cours d'eau, le traitement visant à la régulation de leur développement doit donc être effectué en fonction de la spécificité du cours d'eau.

6- Evolution des biofilms le long d'un cours d'eau, la Chaudanne, à l'aval des charges apportées par des sources chaudes sulfureuses et un établissement thermal : hypothèse de l'existence d'un processus d'autoépuration

Comme cela a déjà été précisé, la ville d'Aix-les-Bains possède deux sources hydrothermales chroniquement contaminées par la bactérie *Lpn*. Ces sources ne peuvent donc plus être directement exploitées par les établissements thermaux. Des forages ont alors été construits de manière à prélever la ressource thermique en amont de la contamination. Le forage Reine Hortense est un forage semi-profond tandis que le forage Chevalley est un forage profond. Ils puisent l'eau à une profondeur respective de 1100 et 2200m (Gallino, 2006). Mais les sources naturelles continuent d'exister et se déversent de manière naturelle dans le ruisseau de la Chaudanne, l'un des affluents du lac de Bourget (Figure 11 et Figure 14).

L'établissement des thermes Chevalley possède un bassin recevant les eaux thermales après leur usage dans l'établissement. Cette bêche de rejet se déverse ensuite dans le même réseau hydrographique, en aval du rejet des deux sources thermales. Ces eaux chaudes modifient les paramètres physico-chimiques de l'eau de la Chaudanne et représentent également une source potentielle d'arrivées de *Lpn* dans la rivière.

L'objectif de cette partie du travail était d'estimer l'occurrence de *Lpn* dans les biofilms à l'aval des points de confluence avec les eaux thermales et d'identifier les facteurs de régulation des différents états physiologiques de *Lpn* le long de ce réseau hydrographique. Nous avons recherché, notamment, l'existence d'un éventuel antagonisme entre *Lpn* et les bactéries que nous avons désignées sous l'expression " *Pseudomonas* et bactéries apparentées" en liaison avec l'absence de spécificité des techniques de dénombrement utilisées (§ 3.4.1.4. et § 3.4.1.7).

L'étude a été menée sur 5 points de prélèvement choisis en fonction de leur localisation le long du réseau mais également en fonction de leur accessibilité. La station Mirabeau, située en amont de tous les rejets connus, permet d'identifier l'état de référence du réseau. La station Parking est située à l'aval de l'arrivée des sources thermales, mais en amont de la confluence avec les eaux provenant de la bêche de rejet. Les stations Liège, Lepic et Aquarium sont distribuées entre le point de confluence avec la bêche de rejet des thermes et la confluence avec le lac (Figure 14).

Rappelons ici que six campagnes de prélèvement ont été conduites (Tableau 5). Le mode de prélèvement a été le même que pour le volet précédent, à savoir l'utilisation de substrats artificiels mis à incuber dans le milieu pendant 15 jours. La température de l'eau et le débit ont été enregistrés au niveau de chaque station avec un pas de temps de 15 minutes sur une période de 2 ans couvrant ainsi l'ensemble des campagnes (Tableau 10), grâce à l'installation de limnigraphes. Les enregistrements au niveau de la station Liège n'ont pas été complets en raison des dommages apportés à la membrane du capteur par un important dépôt de calcaire. Les particularités de cette station ont cependant pu être mises en évidence, et notamment le fait qu'elle présente les eaux les plus chaudes et les plus rapides (une valeur de 3 m/s a été mesurée au moulinet lors d'un jaugeage). L'importance de la vitesse de l'eau dans cette station explique le fait que les biofilms y soient plus denses et homogènes que dans les autres stations (Figure 80).

Comme dans le volet précédent, nous avons fait le choix de commencer l'analyse des résultats par les descripteurs physiques et chimiques en considérant qu'ils constituent les variables explicatives du système.

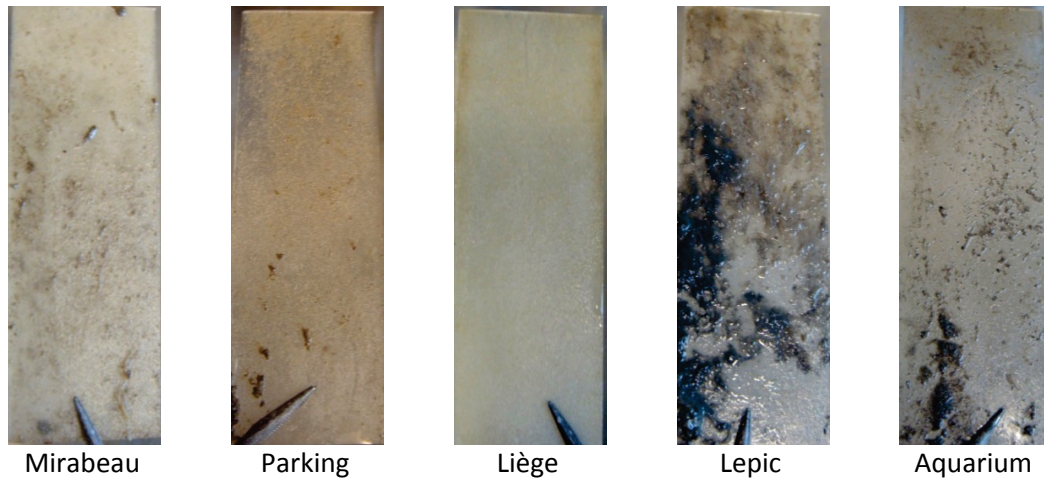


Figure 80: Aspects des biofilms échantillonnés le long du réseau aixois au cours de la campagne de juin 2009.

6.1 Evolution des descripteurs physiques et chimiques le long du réseau hydrographique aixois : modifications dues aux apports des eaux thermales

Ce paragraphe a pour but de déterminer l'importance des modifications des caractéristiques physiques et chimiques du cours d'eau récepteur, du fait de l'apport des eaux thermales. L'origine des sources thermales, leurs caractéristiques physico-chimiques ainsi que la description des 5 stations échantillonnées ont été détaillées dans le paragraphe matériel et méthode (chapitre 3.1.2).

6.1.1 Débit

Le débit a été enregistré au niveau de chaque station à l'aide de limnigraphes réglés sur un pas de temps de 15 minutes pour les besoins de la construction du modèle de transport de charge en fonction des conditions météorologiques (chapitre 9.1). Pour rester cohérent avec le premier volet, c'est le débit moyen journalier qui est pris en compte dans la présente analyse.

Deux périodes peuvent être définies au sujet de l'influence du débit sur le développement des biofilms sur les substrats artificiels : celle des 15 jours pendant lesquels les lames de verre sont mises en incubation, bien entendu, mais aussi celle des 15 jours précédant leur installation dans le milieu (période de pré-incubation). Nous avons arbitrairement défini cette dernière comme étant la période pendant laquelle les changements des conditions hydrodynamiques peuvent avoir une répercussion sur les caractéristiques chimiques, physiques et biologiques de l'eau avec laquelle les lames sont en contact durant la 1^{ère} période. Dans les paragraphes qui suivent, les caractéristiques hydrodynamiques des stations sont analysées sur la base de cette partition du temps. Sur les graphiques, le jour du dépôt des lames est marqué par un axe vertical central.

6.1.1.1 Première campagne (décembre 2007)

Au cours de la première campagne (décembre 2007, Figure 81), la perte des échantillons au niveau de la station Mirabeau a engendré un décalage de 9 jours de la période d'incubation des lames. De ce fait, l'évolution des débits dans cette station est présentée séparément de celles des autres stations. Les débits de la station Liège sont présentés malgré les pertes successives des dispositifs de prélèvement.

Dès cette **première campagne**, le débit maximal apparaît être celui de la station Liège. Il est à noter que la faible hauteur de l'eau dans cette station peut avoir été à l'origine de valeurs de débit erronées du fait de sa proximité de la limite de détection des capteurs. Associée à de fortes vitesses, elle a probablement été aussi à l'origine d'incertitudes importantes des mesures effectuées manuellement lors des jaugeages. Globalement, la station Mirabeau présente des valeurs de débits inférieures à celles des autres stations, si l'on fait exception des pics du 23 novembre et du 5 décembre.

La variabilité du débit pendant la période de pré-incubation est restée faible au cours de cette campagne. On note la présence de deux pics, respectivement au début et vers la fin de l'incubation. Les deux pics sont également présents à la station Mirabeau mais ils sont plus proches l'un de l'autre. On remarque que les débits au niveau de la station Liège sont supérieurs à ceux de la station Lepic, provenant probablement d'une légèrement surestimation à la station Liège. Comme indiqué plus haut, cette surestimation peut être expliquée par la faible hauteur d'eau dans cette station.

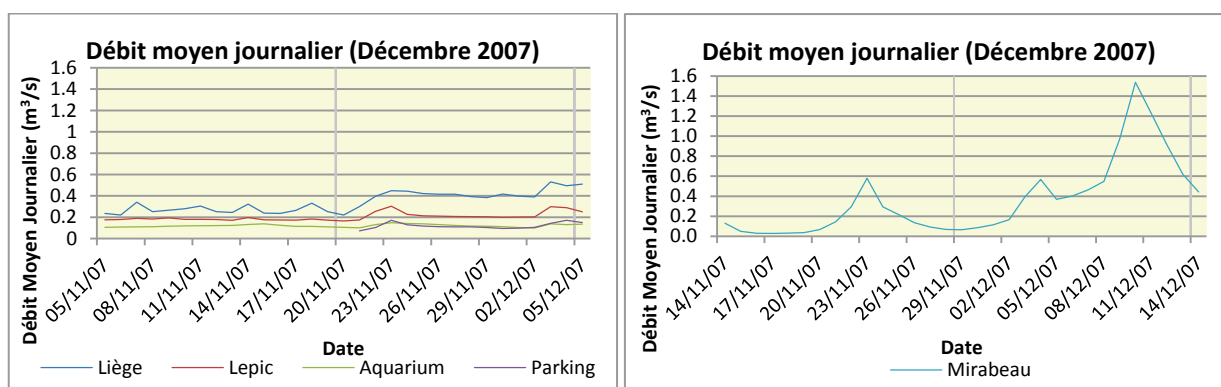


Figure 81: Suivi des débits moyens journaliers le long du réseau au cours de la campagne de décembre 2007.

6.1.1.2 Deuxième campagne (juin 2008)

Pour la **deuxième campagne** (juin 2008), nous avons également été contraints à un décalage, d'un jour seulement, de la période d'incubation des lames, touchant cette fois, la station Aquarium (Figure 82). La station Liège présente de nouveau dans cette campagne des valeurs de débits probablement surestimées car supérieures à celles enregistrées au niveau des stations situées en aval (Lepic et Aquarium). Seule la station Aquarium présente une tendance à l'augmentation de son débit à partir du milieu de la période de pré-incubation et jusqu'à la date de récupération des lames. Dans le même temps, le débit des autres stations présente de nombreuses oscillations mais d'amplitude modérée (qui ne dépassent pas 50% de la valeur du débit de la veille).

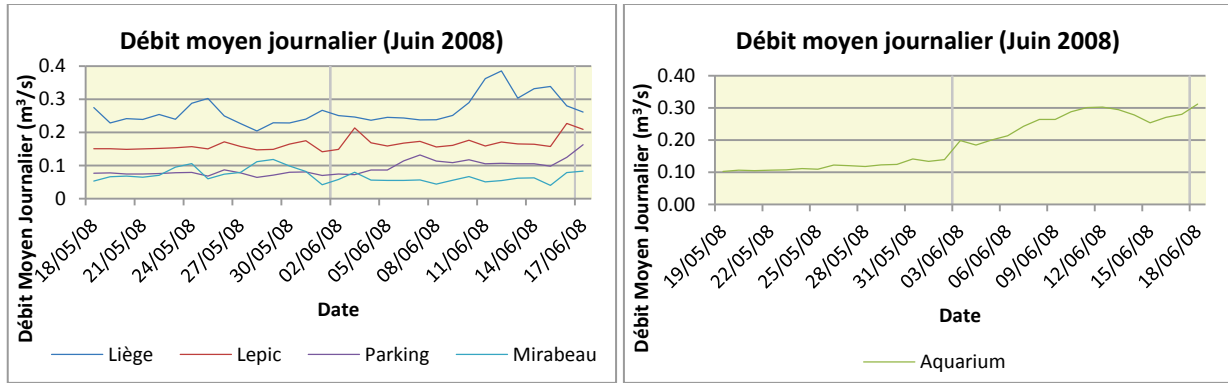


Figure 82 : Suivi des débits moyens journaliers le long du réseau au cours de la campagne de juin 2008.

6.1.1.3 Troisième campagne (septembre 2008)

Malgré la simultanéité des périodes d'incubation pour toutes les stations lors de la **troisième campagne** (septembre 2008), on remarque qu'il existe un jour de décalage des pics de débits entre les stations Mirabeau, Parking et Lepic et ceux la station Aquarium (Figure 83). A partir de cette campagne, les données de débits, mais également de température, sont absentes pour la station Liège. En raison d'un important dépôt de calcaire sur le capteur, la membrane de celui-ci s'est percée entraînant une perte de données à compter du 1^{er} juillet 2008. Pour cette campagne, la succession logique des stations le long du réseau, par référence à leurs débits, est respectée. Seule la station Parking présente des oscillations significatives pendant la période de pré-incubation. Toutes en font apparaître, par contre, durant la période d'incubation que ce soit entre les jours 1 et 2 ou 3 et 4, et plus tard entre les jours 8-9, 9-10 ou 10-11. Ces dernières augmentations de débits ont probablement eu plus de conséquences sur le développement des biofilms que celles du début de l'incubation.

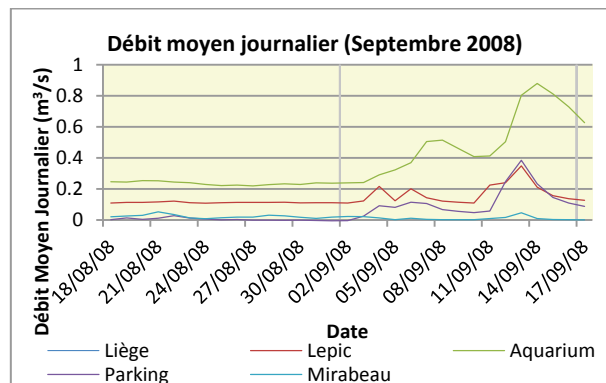


Figure 83 : Suivi des débits moyens journaliers le long du réseau au cours de la campagne de septembre 2008.

6.1.1.4 Quatrième campagne (décembre 2008)

La **quatrième campagne** a eu lieu au mois de décembre 2008 sans qu'il y ait de décalage entre les stations (Figure 84). Les valeurs de débit restent faibles pour la saison ($<0.1 \text{ m}^3/\text{s}$). On note qu'elles sont supérieures à la station Lepic par comparaison à la station Aquarium alors que cette dernière se situe plus à l'aval. Les débits enregistrés au niveau de la station Mirabeau sont quasiment nuls. On remarque la présence d'un pic de débit assez marqué dans toutes les stations, le 6 décembre 2008. Il ne dépasse la valeur seuil de 50% du débit de la veille que dans la station Mirabeau (cette particularité n'est pas visible sur le graphique en raison de l'échelle utilisée). Quelques augmentations de débits ont également lieu au tout début de la période de pré-incubation, et durant les jours précédant la mise en place des substrats artificiels, mais l'amplitude de ces variations reste faible (inférieures à 50% d'augmentation en 24h).

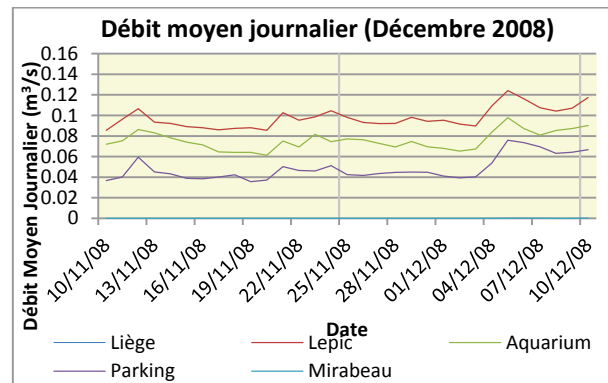


Figure 84 : Suivi des débits moyens journaliers le long du réseau au cours de la campagne de décembre 2008.

6.1.1.5 Cinquième campagne (mars 2009)

L'**avant-dernière campagne** s'est déroulée au mois de mars 2009. Là encore les débits restent faibles ($<1 \text{ m}^3/\text{s}$) (Figure 85). On note une première augmentation de débit plutôt marquée après 5 jours d'incubation (les 6 et 7 mars 2009). Dans les jours qui suivent, les débits oscillent avec une tendance à la baisse durant le reste de la période d'incubation. Cette augmentation ne représente une hausse de débit de plus de 50% que dans la station Mirabeau. Pour toutes les stations, la période de pré-incubation présente uniquement une tendance à la baisse du débit.

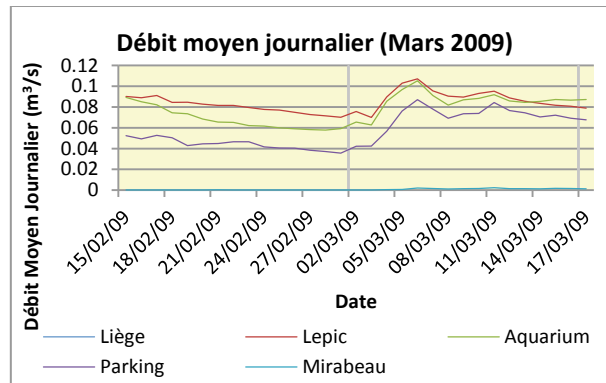


Figure 85 : Suivi des débits moyens journaliers le long du réseau au cours de la campagne de mars 2009.

6.1.1.6 Sixième campagne (juin 2009)

La **dernière campagne** date du mois de juin 2009. Elle fait apparaître deux pics de débits durant les premiers jours de l'incubation, dont seul le premier est significatif pour les stations Mirabeau et Parking (Figure 86). Par la suite, les autres stations voient leur débit se stabiliser ou diminuer légèrement. La station Aquarium se distingue avec une tendance à une augmentation du débit jusqu'à l'avant dernier jour de l'incubation. Les débits de la période de pré-incubation restent une fois de plus assez stables malgré un pic au deuxième jour et deux jours après le dépôt des lames. Les augmentations restent cependant inférieures au seuil de 50%/24h.

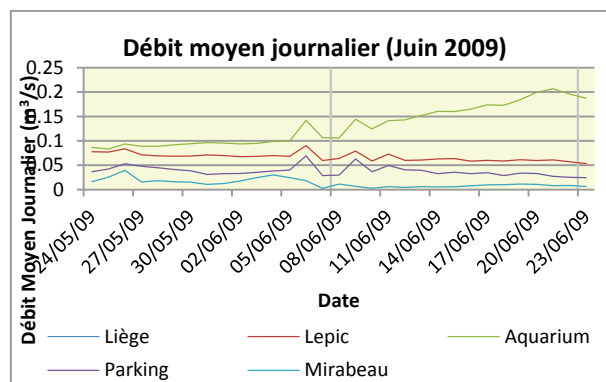


Figure 86: Suivi des débits moyens journaliers le long du réseau au cours de la campagne de juin 2009.

En conclusion de ce 1^{er} examen des enregistrements de débits, il peut être conclu à la similarité des stations du point de vue de l'évolution globale de ce descripteur dans le temps, à l'exception du décalage observé au cours de la campagne de septembre 2008.

Tableau 74 : Tableaux récapitulatifs des caractéristiques des débits de chaque station pour chaque période de chaque campagne d'échantillonnage (ΔQ = variation de débit).

décembre-07	pré-incubation			incubation		
Station	Débit min	Débit max	Débit médian	Débit min	Débit max	Débit médian
Mirabeau	0.028	0.578	0.093	0.064	1.539	0.555
Parking	-	-		0.071	0.171	0.110
Liège	0.221	0.341	0.252	0.221	0.531	0.415
Lepic	0.171	0.196	0.179	0.165	0.303	0.208
Aquarium	0.105	0.137	0.116	0.099	0.149	0.127

juin-08	pré-incubation			incubation		
Station	Débit min	Débit max	Débit médian	Débit min	Débit max	Débit médian
Mirabeau	0.042	0.119	0.074	0.040	0.083	0.056
Parking	0.064	0.087	0.077	0.073	0.163	0.106
Liège	0.204	0.303	0.240	0.237	0.386	0.256
Lepic	0.142	0.175	0.151	0.149	0.227	0.166
Aquarium	0.102	0.141	0.118	0.185	0.312	0.267

septembre-08	pré-incubation			incubation		
Station	Débit min	Débit max	Débit médian	Débit min	Débit max	Débit médian
Mirabeau	0.008	0.053	0.018	0.001	0.046	0.006
Parking	-0.005	0.027	0.001	-0.004	0.384	0.089
Liège						
Lepic	0.108	0.121	0.113	0.109	0.348	0.140
Aquarium	0.219	0.253	0.237	0.239	0.879	0.482

décembre-08	pré-incubation			incubation		
Station	Débit min	Débit max	Débit médian	Débit min	Débit max	Débit médian
Mirabeau	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
Parking	0.036	0.059	0.042	0.039	0.076	0.045
Liège						
Lepic	0.085	0.106	0.092	0.090	0.124	0.098
Aquarium	0.061	0.086	0.074	0.065	0.098	0.077

mars-09	pré-incubation			incubation		
Station	Débit min	Débit max	Débit médian	Débit min	Débit max	Débit médian
Mirabeau	0.000	0.000	0.000	0.000	0.002	0.001
Parking	0.036	0.053	0.044	0.042	0.087	0.073
Liège						
Lepic	0.070	0.091	0.082	0.070	0.107	0.089
Aquarium	0.058	0.089	0.065	0.063	0.105	0.087

juin-09	pré-incubation			incubation		
Station	Débit min	Débit max	Débit médian	Débit min	Débit max	Débit médian
Mirabeau	0.003	0.040	0.018	0.003	0.011	0.007
Parking	0.029	0.069	0.039	0.025	0.063	0.033
Liège						
Lepic	0.060	0.090	0.070	0.053	0.079	0.060
Aquarium	0.083	0.142	0.094	0.106	0.206	0.163

6.1.2 Température

La température de l'eau de chaque station a été enregistrée simultanément à celle du débit à l'aide des mêmes capteurs. Les modifications liées à l'arrivée des eaux thermales, qu'elles proviennent des sources ou de la bêche de rejet, ont ainsi pu être mises en évidence. Pour la station Liège le suivi n'a été enregistré que jusqu'en juillet 2008 en raison de la perte des données du capteur. C'est la raison pour laquelle nous limiterons ici la comparaison des 3 stations, Mirabeau, Parking et Liège à la période allant du 26 novembre au 3 décembre 2007 (Figure 87). Les caractéristiques thermiques de chaque station sont résumées ensuite dans le Tableau 75.

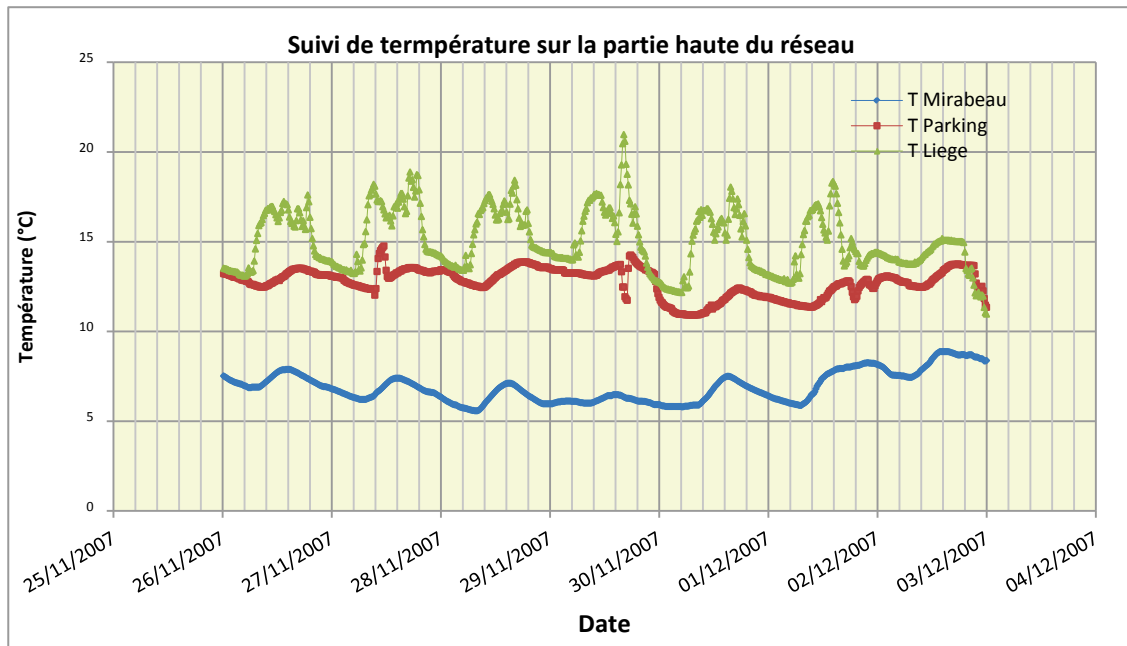


Figure 87 : Evolution de la température sur la partie haute du réseau dans la période du 26 novembre au 3 décembre 2007

On observe des variations nycthémérales de la température de l'eau en amont de toute arrivée d'eau thermique. Ces variations restent visibles jusqu'à la station Parking, c'est-à-dire après l'arrivée des sources thermales. Le décalage du niveau de base de la température dans cette station par rapport à celui de la station aérienne (Mirabeau) est constant à l'échelle de la journée, ce qui confirme un apport d'eau assez régulier en provenance des sources thermales. Cela n'est plus le cas au niveau de la station Liège c'est-à-dire à partir du point d'arrivée des eaux de la bache de l'établissement thermal. Cet apport n'est donc pas constant en termes de volume et/ou de température. On peut considérer que la perturbation est minime, puisque durant la nuit, la température de l'eau n'augmente que de 1.1°C entre les stations Parking et Liège (Figure 87). Par contre, dans les périodes de forte perturbation, la différence de température entre ces deux stations passe à 3.8°C, soit une augmentation de 29.3% de la température de base. A chaque apport, il faut environ 4h45 pour la montée en température, puis la perturbation maximale se maintient pendant environ 8h, et 4h approximativement sont nécessaires au refroidissement. La perturbation thermique dure ainsi 17h.

Afin de compléter l'étude des différentes campagnes de prélèvements, et grâce aux enregistreurs, nous pouvons suivre l'évolution de la température de l'eau.

L'influence de la température de l'eau de la période de pré-incubation sur le développement des biofilms recueillis sur les lames de verre n'a pu qu'être très indirecte. C'est la raison pour laquelle seule la période d'incubation sera considérée dans les paragraphes qui suivent pour l'analyse des particularités des campagnes et des stations selon ce descripteur. Comme pour les débits, les valeurs prises en compte sont les moyennes journalières.

6.1.2.1 Décembre 2007

On remarque tout d'abord que les variations enregistrées à la station Mirabeau, durant la **première campagne** (Figure 88), suivent celles du capteur situé dans la partie aérienne du réseau, qui en est aussi la partie haute. Les variations enregistrées dans les stations souterraines, par contre, suivent celles du capteur aérien placé dans la partie souterraine du réseau au niveau de la station dans laquelle la température de l'eau était la plus chaude. Ces observations laissent supposer que le ruisseau influence significativement la température de l'air de la partie souterraine.

La station Mirabeau présente logiquement les températures les plus faibles. A l'inverse, les températures les plus élevées sont enregistrées à la station Liège. On remarque pour toutes les stations souterraines, une baisse marquée de la température entre le 22 et le 23 novembre 2007. La température se stabilise ensuite avant de diminuer à nouveau de quelques degrés à la fin de la période d'incubation.

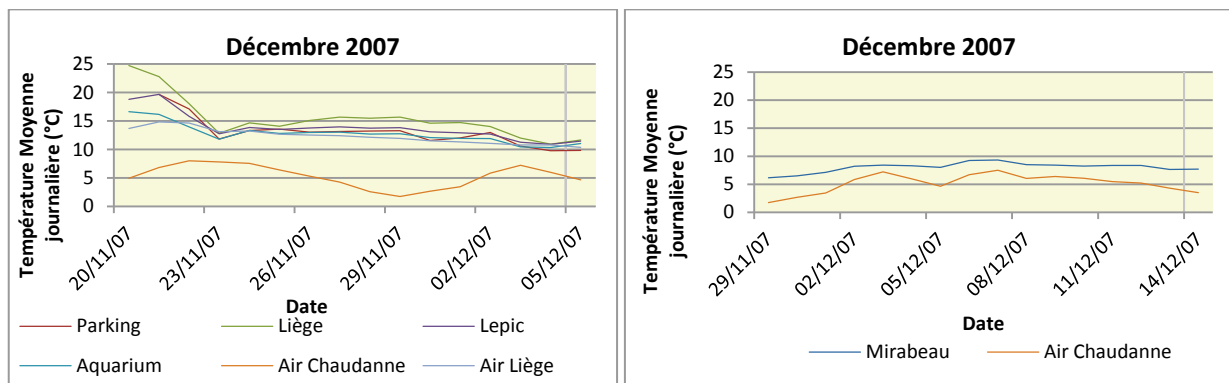


Figure 88 : Suivi de la température moyenne journalière le long du réseau au cours de la campagne de décembre 2007.

6.1.2.2 Juin 2008

En juin (**seconde campagne**, Figure 89), la station Mirabeau garde les températures les plus faibles. Leurs variations suivent bien celles de la température de l'air, que ce soit dans les stations aériennes ou dans les stations souterraines. On remarque une baisse marquée de la température de l'air et de l'eau du 5 au 7 juin 2008. Une seconde baisse a lieu dans toutes les stations souterraines durant les derniers jours de l'incubation. Sur l'ensemble de cette période, la température de l'eau peut tout de même être considérée comme assez stable.

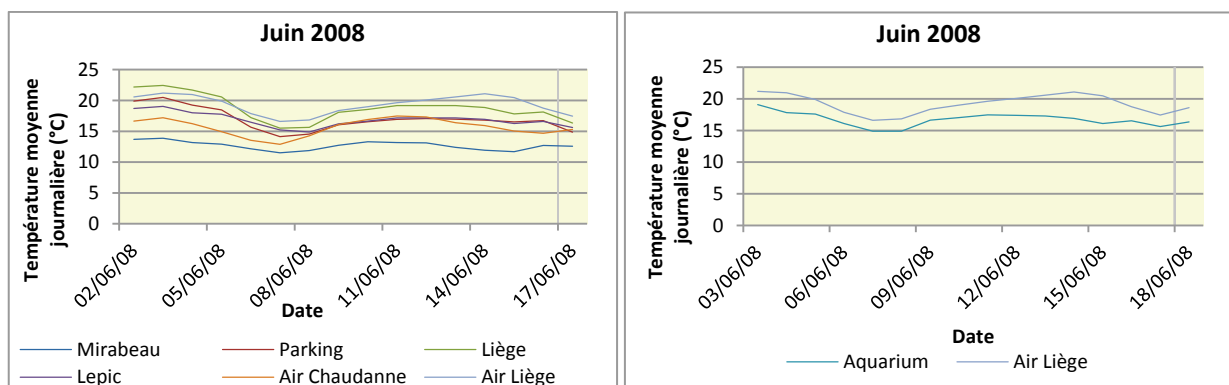


Figure 89 : Suivi de la température moyenne journalière le long du réseau au cours de la campagne de juin 2008.

6.1.2.3 Septembre 2008

Contrairement à la campagne de juin, la campagne de septembre 2008 (3^{ème} campagne, Figure 90) présente une baisse générale de la température de l'eau tout au long de la période d'incubation, avec tout de même une légère remontée entre le 9 et le 11 septembre. On remarque également que la différence de température entre les stations du réseau est plus importante en début de période qu'à la fin. Comme en juin la température de l'air reste toujours supérieure à celle de l'eau que ce soit pour la station aérienne ou les stations souterraines.

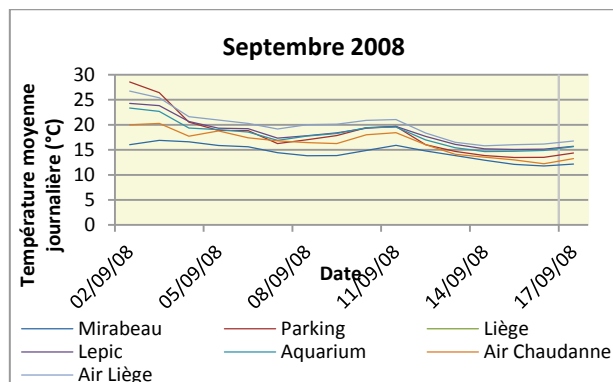


Figure 90 : Suivi de la température moyenne journalière le long du réseau au cours de la campagne de septembre 2008.

6.1.2.4 Décembre 2008

En décembre 2008 (4^{ème} campagne, Figure 91), comme pour l'année 2007, la température de l'eau est supérieure et ses variations sont atténuées par comparaison à celle de l'air. Un léger décalage est même observé entre les stations souterraines et la station Mirabeau. Dans cette dernière, la température de l'eau reste assez stable, sans tendance marquée alors que dans les stations souterraines, on note une légère tendance à la baisse.

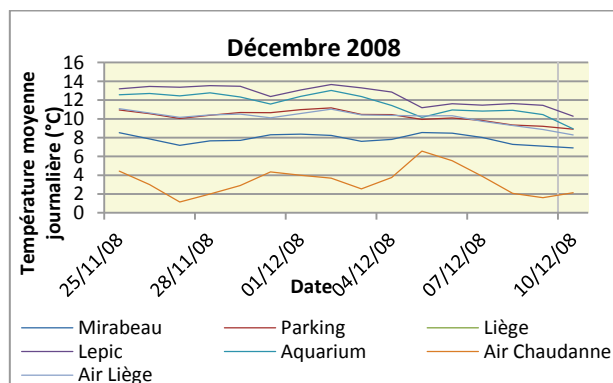


Figure 91 : Suivi de la température moyenne journalière le long du réseau au cours de la campagne de décembre 2008.

6.1.2.5 Mars 2009

Lors de la campagne de mars 2009 (5^{ème} campagne, Figure 92), la température de l'air reste inférieure à celle de l'eau sauf, ponctuellement, au cours des derniers jours d'incubation. Les premiers jours de l'incubation montrent une baisse de la température de l'eau, puis elle remonte jusqu'à la fin de l'incubation pour atteindre une valeur équivalente à celle du jour de la mise en place des lames.

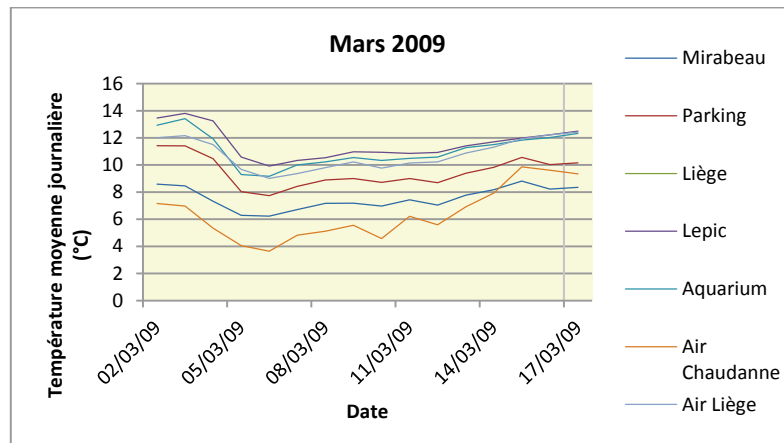


Figure 92 : Suivi de la température moyenne journalière le long du réseau au cours de la campagne de mars 2009.

6.1.2.6 Juin 2009

Comme en 2008, la campagne de juin 2009 (6^{ème} campagne, Figure 93) se caractérise par une température de l'air supérieure à celle de la rivière. A la station Mirabeau, la température de l'eau, tout comme celle de l'air, reste stable sur l'ensemble de la période alors que dans le même temps, elle a tendance à augmenter légèrement au niveau des stations souterraines. La différence entre la station Mirabeau et les stations souterraines est importante (>5°C), durant cette période.

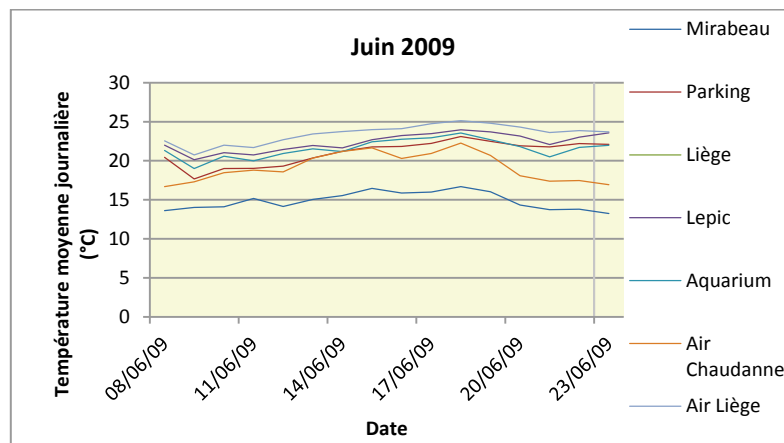


Figure 93 : Suivi de la température moyenne journalière le long du réseau au cours de la campagne de juin 2009.

Tableau 75 : Tableau récapitulatif des températures minimales/maximales/médianes pour chaque station au cours de chaque campagne.

		déc-07	juin-08	sept-08	déc-08	mars-09	juin-09
Mirabeau	min	6.50	11.51	11.78	6.90	6.23	13.24
	max	9.33	13.88	16.89	8.55	8.81	16.68
	médiane	8.26	12.73	14.61	7.84	7.38	14.69
Parking	min	9.77	14.13	13.47	8.91	7.74	17.67
	max	19.68	20.49	28.54	11.17	11.42	23.10
	médiane	13.03	16.77	17.44	10.43	9.20	21.78
Liège	min	16.00	16.00				
	max	24.73	22.44				
	médiane	14.70	18.70				
Lepic	min	10.91	14.88	15.07	10.29	9.92	20.13
	max	19.68	19.05	24.27	13.65	13.81	23.97
	médiane	13.63	16.79	18.12	12.96	11.19	22.39
Aquarium	min	10.34	14.90	14.66	8.93	9.17	19.00
	max	16.64	19.08	23.36	13.02	13.42	23.56
	médiane	12.72	16.78	18.01	11.95	10.93	21.62

6.1.2.7 Influence des arrivées d'eaux thermales sur la température du cours d'eau récepteur

Dans les paragraphes qui suivent nous avons cherché à mettre en évidence de façon plus fine l'effet de l'arrivée des eaux thermales sur la température de l'eau du réseau. Dans ce but, les stations sont comparées sur la base de leurs écarts de température vis-à-vis de celle de la station Mirabeau, prise pour référence. En outre, pour chacune des stations, les valeurs des écarts au sein d'une même campagne sont représentées par leur médiane et leur dispersion par le MAD.

L'analyse des coefficients de variations (CV_{MAD}) à partir des valeurs de l'ensemble des stations montre que les campagnes de septembre et de mars sont globalement celles qui présentent les plus fortes variabilités (Tableau 76). Du fait de cette variabilité tout au long de la période d'incubation, il s'agit également des campagnes pour lesquelles la différence entre la station Mirabeau et les autres stations est la moins marquée. D'une manière générale, on remarque qu'il n'existe pas de saisonnalité dans la variabilité de la température au niveau de la station Mirabeau. A l'inverse, les autres stations montrent des CV_{MAD} compris entre 4.5 et 6% lors des campagnes de décembre et entre 3 et 4% lors de celles de juin.

Tableau 76 : Variabilité (MAD/Médiane) de la température médiane au cours de la période d'incubation (CV_{MAD} en %)

	Décembre 07	Juin 08	Septembre 08	Décembre 08	Mars 09	Juin 09
Mirabeau	2.97	4.01	8.73	6.38	9.89	6.33
Parking	7.75	5.46	14.31	4.12	8.75	2.92
Liège	6.70	6.29				
Lepic	5.80	3.31	9.85	4.44	6.48	3.97
Aquarium	6.29	4.08	8.16	6.66	8.42	4.26

Bien qu'elles se situent à des saisons opposées sur le plan de la température atmosphérique, les deux premières campagnes présentent des profils d'écart thermique très comparables (Figure 94). L'augmentation de température débute à la station Parking, puis se poursuit au niveau de la station Liège, témoignant des apports d'au moins deux arrivées d'eaux thermales.

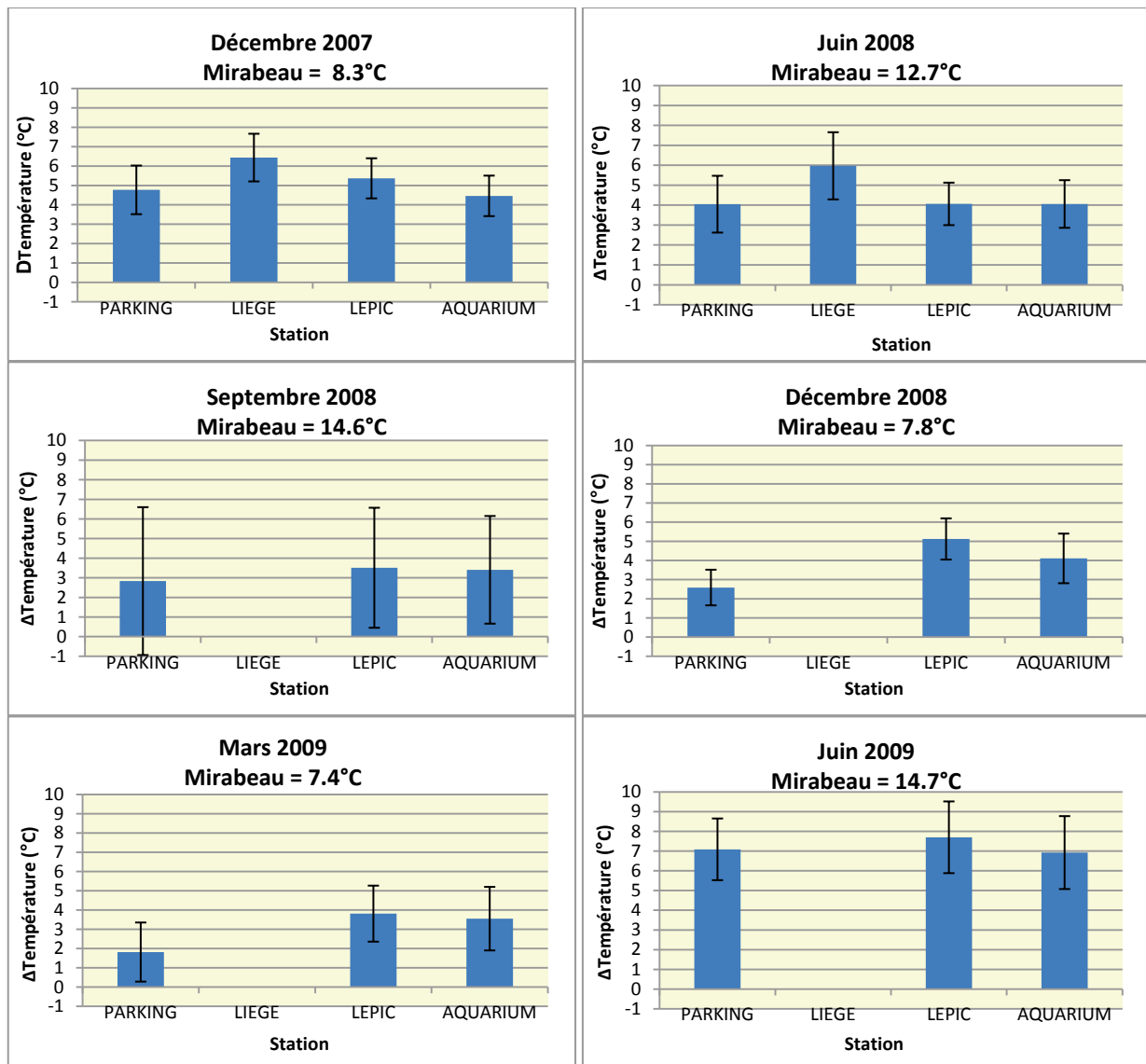


Figure 94 : Comparaison des stations sur la base des écarts de leur température vis-à-vis de celle de la station Mirabeau, prise pour référence (Valeur indiquée dans l'entête de chaque figure). Pour chacune des stations, les valeurs des écarts au sein d'une même campagne sont représentées par leur médiane. Les barres d'erreurs correspondent au MAD.

Pour les campagnes suivantes, nous pensons pouvoir faire l'hypothèse d'un écart maximum de température restant localisé au niveau de la station Liège, si l'on tient compte des écarts observés entre les stations Parking et Lepic.

A l'arrivée au lac, la température de l'eau reste supérieure de 3 à 7°C à celle de la partie amont du réseau. Sa valeur est comprise entre 7.4 et 8.2°C en décembre et mars et entre 12.7 et 14.7°C pour les campagnes de juin et septembre.

Nous avons également fait l'essai de comparer les campagnes de mesure et les stations sur la base du calcul des "degrés jours" qui sont censés représenter la quantité de chaleur vue par les biofilms au cours de leur développement. Les résultats sont très proches de ceux obtenus à partir des médianes des écarts de température en prenant la station Mirabeau pour référence. Ils ne seront donc pas présentés ici mais seront utilisés plus loin, dans la suite de ce mémoire.

L'une des principales conclusions des analyses qui précèdent est le constat du maintien d'une partie des modifications des caractéristiques physiques engendrées par les arrivées d'eaux thermales au niveau de l'exutoire sur le lac du Bourget.

6.1.3 Autres caractéristiques physiques et chimiques de l'eau

Outre la température et les débits, le pH, le COD, la conductivité, ainsi que plusieurs concentrations ioniques de l'eau ont été suivis tout au long du réseau. Les analyses ont été faites sur des échantillons qui intégraient des prélèvements effectués tous les quarts d'heure pendant 24 heures.

L'objectif étant de mettre en évidence l'influence des arrivées d'eaux thermales, les résultats sont présentés comme ceux de la température dans les paragraphes précédents, sous la forme de la différence entre la valeur de chaque descripteur à chaque station et la valeur du même descripteur à la station Mirabeau.

6.1.3.1 Le pH

Sur l'ensemble des prélèvements les valeurs du pH au niveau de la station Mirabeau ont été comprises entre 8 et 8.2. Ses variations n'apparaissent pas être liées au facteur saisonnier malgré le caractère aérien de la station, ce qui indique que les eaux de la Chaudanne sont fortement tamponnées.

Les résultats font cependant apparaître des variations du pH du cours d'eau après les arrivées d'eaux thermales qui diffèrent selon les stations et selon les campagnes (Figure 95). Si l'on fait abstraction de la campagne de septembre 2008, nous pouvons conclure à une influence effective et localisée de l'arrivée des eaux thermales sur ce descripteur, puisque ses valeurs dans les deux stations les plus en aval sont très proches de celles de la station de référence. Le pH des eaux thermales est effectivement légèrement inférieur à celui de la neutralité ce qui explique les observations faites au niveau de la station Parking pour 4 des 6 campagnes.

Il semble par contre que les apports de la bêche soient plutôt alcalinisants, probablement en liaison avec les traitements effectués au niveau de l'établissement thermal, lors des nettoyages des soins par exemple. Ces apports semblent avoir été particulièrement importants lors de la campagne de septembre 2008 puisque leur influence sur le pH pourrait s'être prolongée jusqu'à la station Lepic. Cette remarque n'explique pas le fait que le pH soit souvent plus alcalin au niveau de la station Aquarium. L'existence d'un apport "sauvage" non documentée en amont de cette station et en aval de la station Lepic est à envisager.

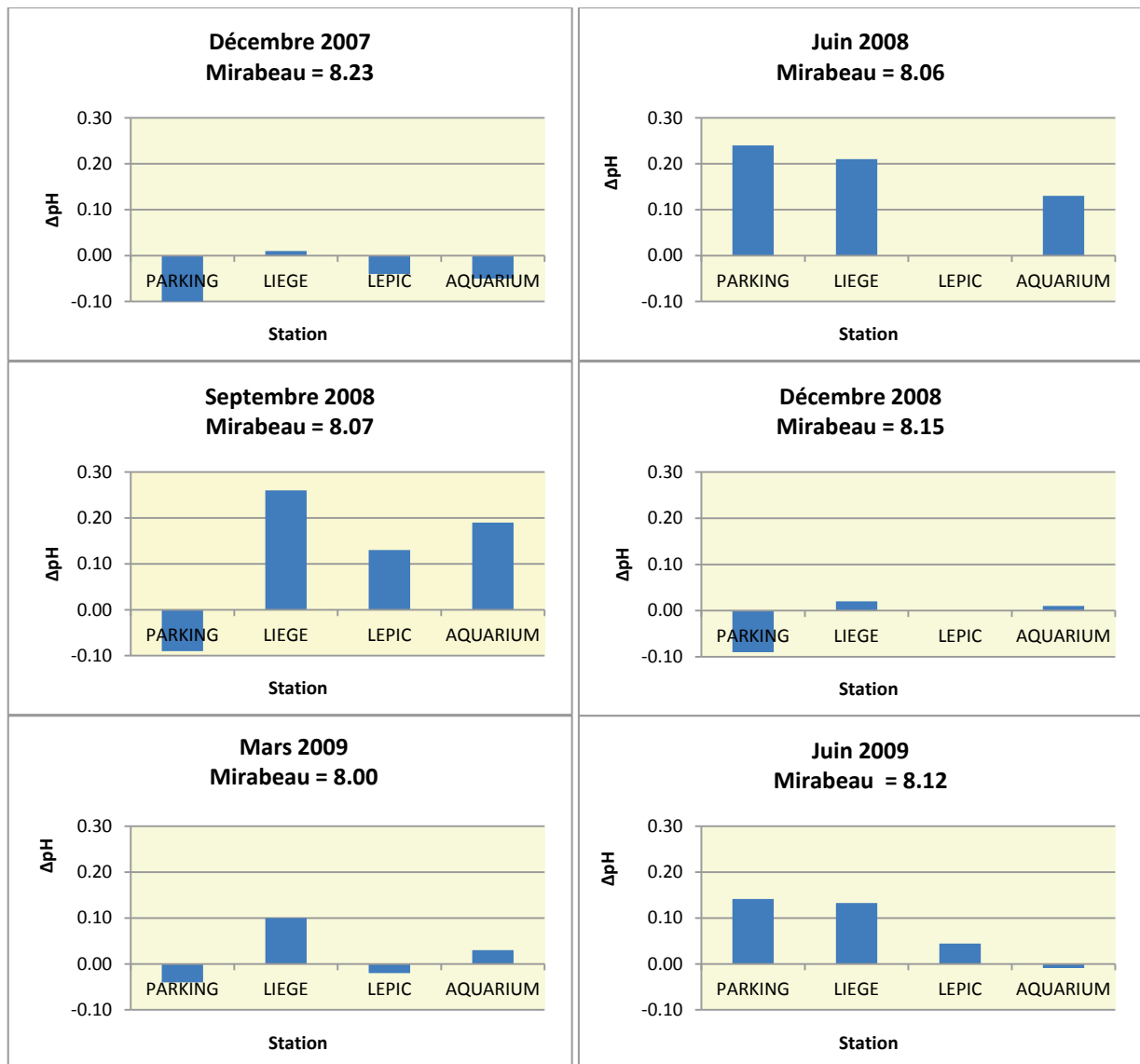


Figure 95 : Comparaison des stations sur la base des écarts de leur pH vis-à-vis de celui de la station Mirabeau, prise pour référence (Valeur indiquée dans l'entête de chaque figure). Pour chacune des stations, les valeurs des écarts au sein d'une même campagne sont représentées par leur médiane. Les barres d'erreurs correspondent au MAD.

6.1.3.2 Le Carbone Organique Dissous (COD)

L'arrivée d'eau thermique n'a pas toujours le même impact sur la concentration en COD de l'eau comme le montre la Figure 96. De façon générale, son apport en COD est très faible voire nul. Il se traduit même par une dilution de l'eau lors de la campagne de juin 2009.

Cet effet de dilution du COD est encore plus marqué du fait de l'apport de la bêche si l'on se réfère aux observations de la station Liège. Pour deux des campagnes seulement (décembre 2008 et mars 2009), cet apport s'est traduit par un enrichissement en COD.

C'est la confluence avec le Tillet (entre les stations Liège et Lepic) qui est presque systématiquement associée à une augmentation du COD du cours d'eau, augmentation qui reste sensible jusqu'à la station Aquarium. La campagne de juin 2008 montre l'existence d'un apport ponctuel issu d'une source non documentée en amont de cette station.

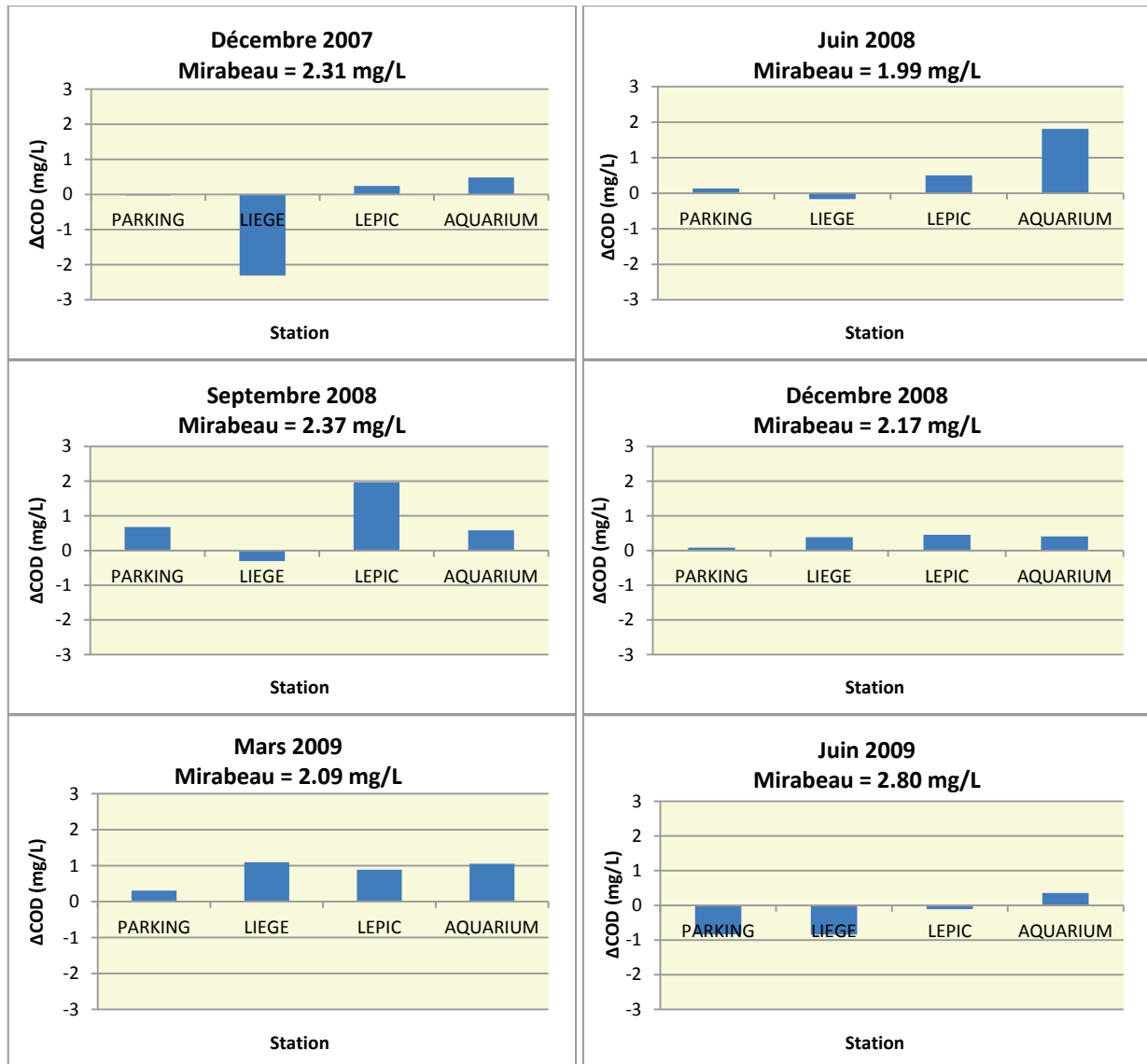


Figure 96 : Comparaison des stations sur la base des écarts de la concentration en COD vis-à-vis de la concentration au niveau de la station Mirabeau, prise pour référence (Valeur indiquée dans l'entête de chaque figure). Pour chacune des stations, les valeurs des écarts au sein d'une même campagne sont représentées par leur médiane. Les barres d'erreurs correspondent au MAD.

Pour conclure à propos de ce descripteur, les résultats montrent, comme pour le pH, que les effets de l'arrivée des eaux thermales sur la concentration en COD des cours d'eau sont masqués par les apports du ruisseau du Tillet.

6.1.3.3 Les espèces ioniques et la conductivité

Les concentrations de 10 espèces ioniques ont été suivies tout au long de l'étude. La concentration en ammonium n'est pas présentée pour la station Mirabeau (Tableau 77), car cet ion y est toujours absent. La concentration des phosphates dans cette partie haute du bassin versant est étonnante sachant que l'agriculture n'y est pas très développée. Les valeurs de $30 \mu\text{g.L}^{-1}$ enregistrées en décembre 2007 et septembre 2008 représentent le double environ de la concentration actuelle dans le lac du Bourget. On note que les valeurs les plus faibles sont bien enregistrées pendant les périodes de grande activité biologique. Les concentrations en nitrates et en magnésium sont assez stables, comprises entre 4.4 et 5.1 mg/L et entre 6.0 et 8.3 mg/L. L'ion le plus concentré est le calcium avec des concentrations comprises entre 32 et 82 mg/L.

Tableau 77 : Concentrations ioniques au niveau de la station Mirabeau.

mg/L	Chlorures	Sulfates	Nitrates	Phosphates	Potassium	Calcium	Sodium	Magnésium
Décembre 07	11.3	16.9	5.1	0.03	1.24	43.4	7.4	8.3
Juin 08	7.1	13.1	4.6	0.01	0.22	81.8	5.9	7.7
Septembre 08	6.2	10.8	4.8	0.03	1.00	61.0	4.0	6.0
Décembre 08	24.6	13.4	4.5	0.02	1.2	32.7	13.7	6.0
Mars 09	10.5	13.9	4.7	0	0.9	54.0	5.9	7.9
Juin 09	12.9	17.1	4.4	0.01	1.6	59.7	7.3	7.6

Les différences de concentrations ioniques des eaux de chaque station par comparaison avec celles de la station de référence (Mirabeau) sont présentées ici sous la forme de graphiques en radar (Figure 97).

Ils montrent que, quelle que soit la saison, l'arrivée des eaux thermales affecte principalement les concentrations en ions sulfates et calcium. Ceci est en accord avec les données précédentes sur les concentrations ionique des eaux thermales au niveau des sources (Tableau 6) qui montrent bien une concentration plus forte de ces espèces ioniques. Les sulfates, pour lesquels la différence des concentrations par rapport à celle du cours d'eau peut atteindre un facteur 10, peuvent donc être considérés comme la signature de l'arrivée des eaux thermales. L'accroissement des concentrations qui en résulte, peut être observé jusqu'à la station Aquarium, malgré l'effet de la dilution.

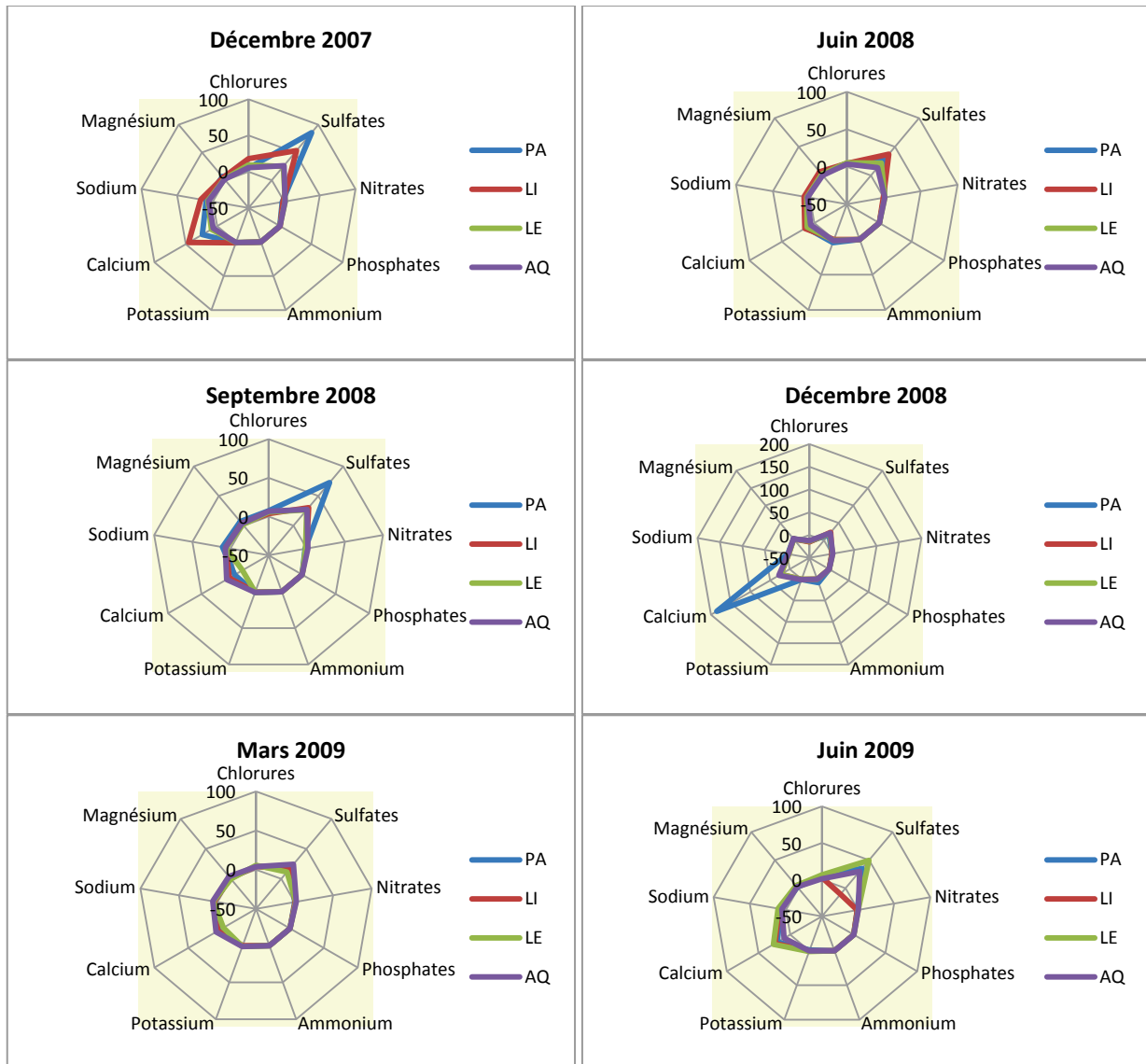


Figure 97 : Comparaison des stations sur la base des écarts des concentrations ioniques par rapport à celles de la station Mirabeau, prise pour référence (Tableau 77). Pour chacune des stations, les valeurs des écarts au sein d'une même campagne sont représentées par leur médiane. Les barres d'erreurs correspondent au MAD. (PA: Parking, LI: Liège, LE: Lepic, AQ: Aquarium).

L'enrichissement des eaux par ces espèces ioniques en modifie évidemment la conductivité (Figure 98). Au niveau de la station Mirabeau, les plus fortes conductivités sont observées au cours des campagnes hivernales, et les plus faibles, en été. Il semble que ces variations soient principalement dues au facteur météorologique, avec les phénomènes érosifs liés aux eaux de ruissellement.

La conductivité augmente toujours à l'aval de l'arrivée d'eau thermique, en amont de la station Parking. Par la suite, tous les cas de figure sont observés : renforcement de la salinité du fait des apports de la bache (décembre 2007, mars et juin 2009), même effet avec en outre la contribution des apports du ruisseau du Tillet (décembre 2008 et mars 2009), effet de dilution sur toute la longueur du réseau (juin 2008), effet de dilution marqué dû à l'apport du ruisseau du Tillet (septembre 2008). Cette campagne et celle de mars 2009 confirment l'existence d'un apport non répertorié situé immédiatement en amont de la station Aquarium.

La combinaison de l'influence des apports des eaux thermales et de celle des apports des affluents a pour conséquence de faire disparaître le caractère saisonnier des variations de conductivité le long du réseau.

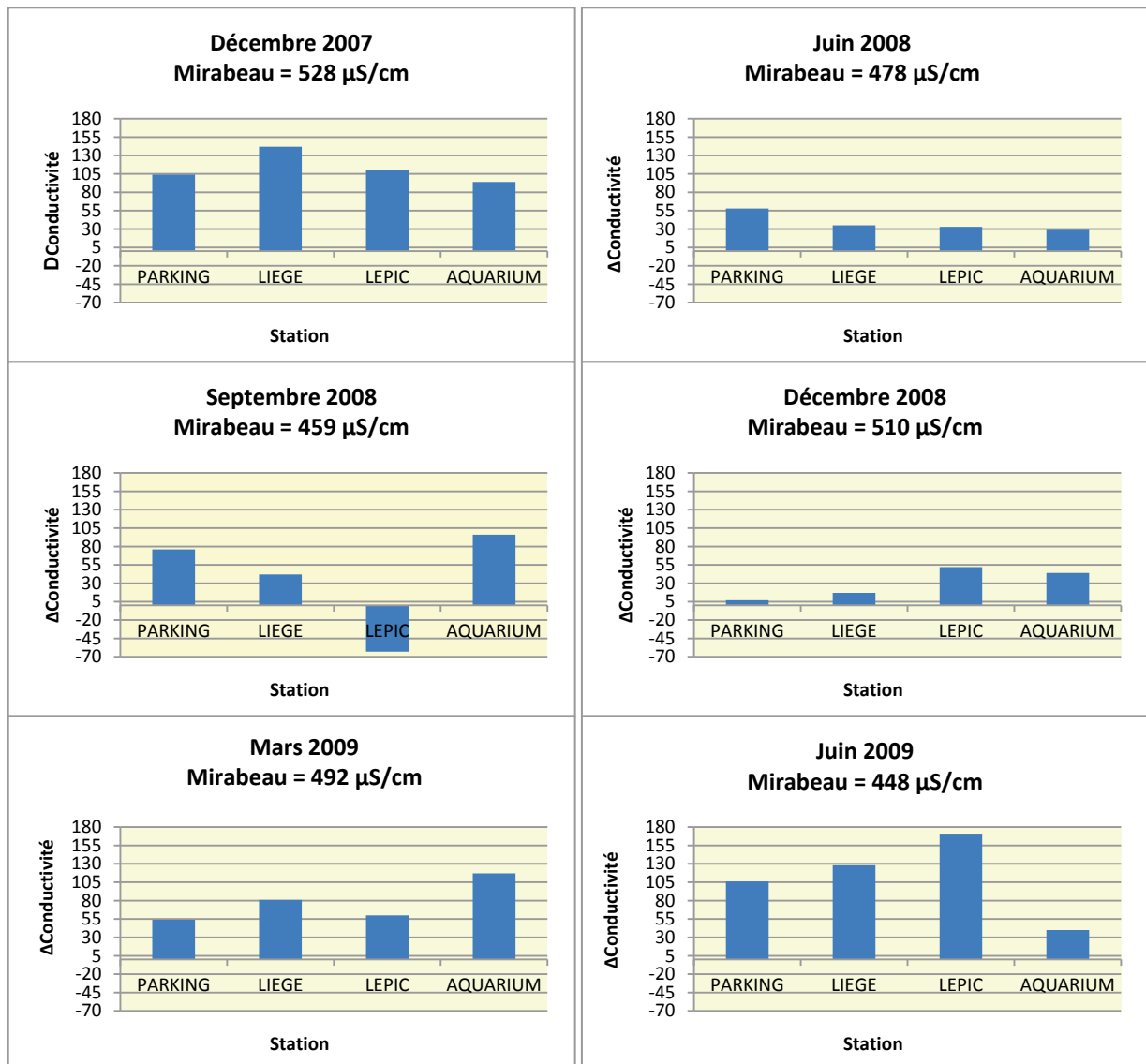


Figure 98 : Comparaison des stations sur la base des écarts de conductivité par rapport à celle de la station Mirabeau, prise pour référence (Valeur indiquée dans l'entête de chaque figure). Pour chacune des stations, les valeurs des écarts au sein d'une même campagne sont représentées par leur médiane. Les barres d'erreurs correspondent au MAD.

Pour conclure de façon partielle au sujet de l'ensemble de ces descripteurs, il est à noter que les caractéristiques de l'eau du réseau au niveau de sa confluence avec le lac du Bourget peuvent encore témoigner de l'effet des apports des eaux thermales : c'est le cas de la température, de la conductivité et des concentrations en potassium, chlorures, sulfates et sodium. Le pH et les concentrations en COD, nitrates et phosphates sont, par contre, plus sous la dépendance des apports du ruisseau du Tillet.

Le magnésium et le calcium représentent des cas particuliers. Après avoir retrouvé une concentration proche de celle de la station de référence, le magnésium augmente semble-t-il en liaison avec l'apport non répertorié évoqué précédemment. La concentration en calcium semble dépendre tout autant des apports thermaux et du Tillet.

6.1.4 Influence des apports thermaux sur le développement des biofilms – Mise en évidence des conséquences des processus d'auto-épuration sur Lpn

Les paragraphes précédents ont été consacrés aux caractéristiques physiques et chimiques de l'eau et à leur évolution le long du réseau étudié. Les stations d'échantillonnage qui se succèdent le long de ce réseau ont ainsi été caractérisées pour les descripteurs principaux qui représentent tout à la fois un cadre environnemental et des contraintes auxquelles sont soumis les microorganismes des biofilms, qu'ils soient autochtones au cours d'eau étudié ou allochtones, tels que ceux qui sont apportés par les eaux thermales contaminées et par les eaux de la bêche.

Dans les paragraphes qui suivent c'est donc l'impact des rejets d'eaux chaudes contaminées en Lpn sur la composition des biofilms du réseau qui est analysé, en considérant tout d'abord les descripteurs généraux des biofilms (poids sec, matière organique, bactéries totales cultivables ou non) puis les évolutions plus particulières de Lpn et des organismes du groupe "*Pseudomonas* et espèces apparentées".

La perte du dispositif d'échantillonnage explique l'absence de résultats pour la station Liège à la première campagne (décembre 2007). L'amélioration du système d'accrochage du dispositif a permis de ne plus rencontrer ce problème par la suite.

6.1.4.1 Poids sec du biofilm et importance de la fraction organique

La Figure 99 montre globalement que le poids sec des biofilms diminue d'amont en aval. La station Parking présente les plus grandes variations avec des valeurs proches de celles des biofilms de la station Mirabeau notamment lors des campagnes de décembre 2007, décembre 2008, mars et juin 2009. Les augmentations de poids sec observées pour les campagnes de juin et septembre 2008 pourraient être dues à des phénomènes de précipitation en rapport avec le fait que cette station est située non loin du passage en souterrain du cours d'eau.

Les résultats de la campagne de septembre 2008 restent cependant très atypiques et pourraient être expliqués par une augmentation marquée des débits enregistrés quelques jours seulement avant la récupération des biofilms. Cette augmentation et celle, consécutive, des forces de cisaillement ont probablement été la cause de remises en suspension de sédiments, de leur redistribution le long du réseau et donc de "l'enrichissement" des biofilms en particules minérales.

La valeur relativement élevée du poids sec des biofilms à la station de référence peut être due au fait que les lames de verre étaient placées dans une cuvette où la vitesse de l'eau était faible et à proximité d'un sédiment principalement constitué de particules fines. A l'inverse, les sédiments dans le réseau canalisé des stations souterraines, étaient peu abondants ou constitués d'éléments beaucoup plus grossiers (graviers, galets).

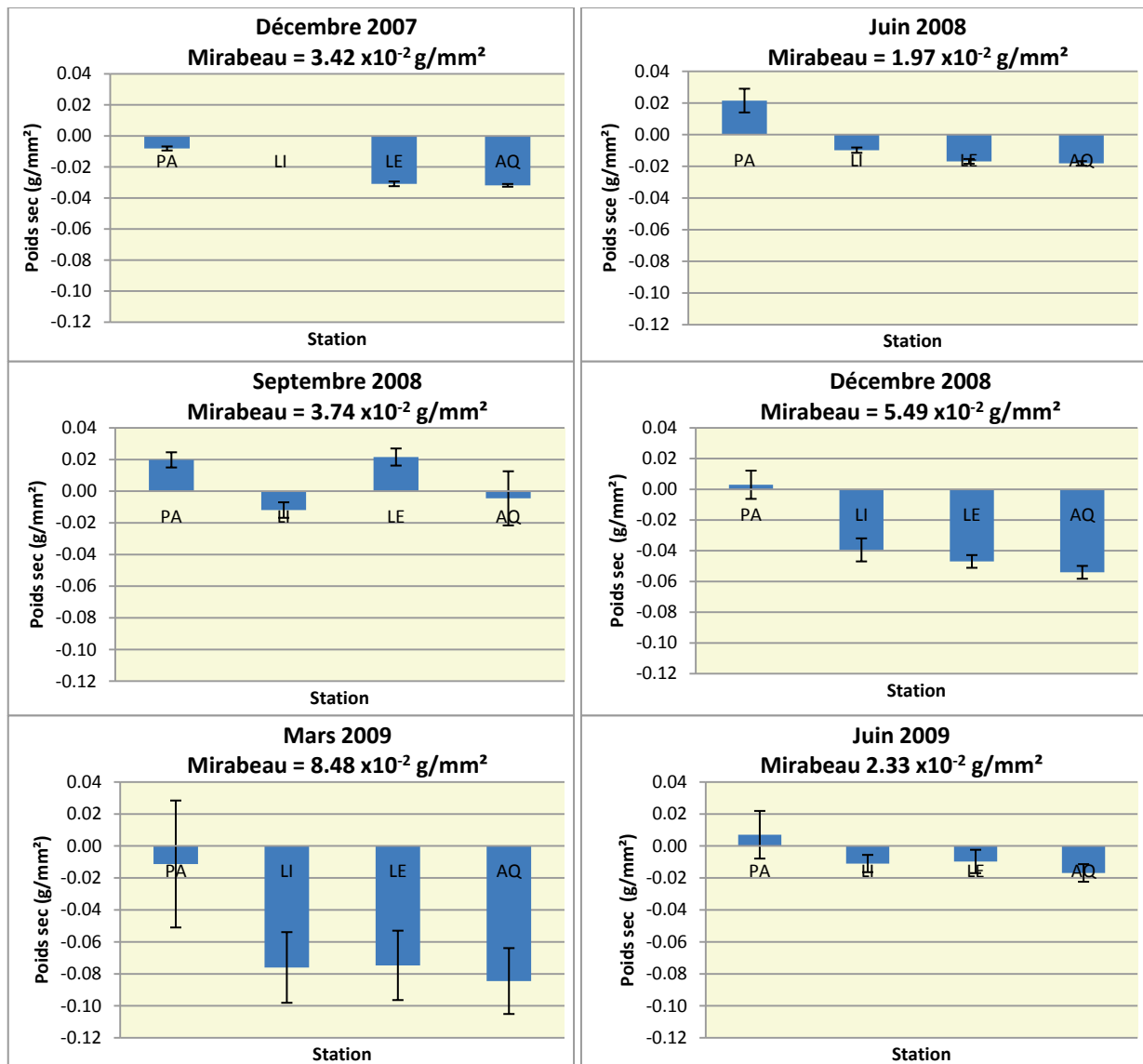


Figure 99 : Comparaison des stations sur la base des écarts du poids sec de biofilm par rapport à la valeur de la station Mirabeau, prise pour référence (Valeur indiquée dans l'entête de chaque figure). Pour chacune des stations, les valeurs des écarts au sein d'une même campagne sont représentées par leur médiane. Les barres d'erreurs correspondent au MAD.

Codes des stations : PA : Parking ; LI : Liège, LE : Lepic, AQ : Aquarium.

L'analyse de la concentration des biofilms en matières organiques (Figure 100) montre qu'elle a tendance à rester stable et à diminuer ponctuellement le long du réseau. Les baisses les plus marquées ont lieu au cours de la campagne de juin 2008. Seuls les biofilms de la station Lepic présentent une légère augmentation en septembre 2008 et en juin 2009 et ceux de la station Aquarium, une forte augmentation en juin 2009. Il est à noter que ces augmentations sont observées lors de deux campagnes pour lesquelles les concentrations en matière organique dans les biofilms de la station Mirabeau sont les plus faibles. Les observations faites au niveau de la station Lepic sont cependant cohérentes avec le constat que nous faisons précédemment du rôle prépondérant des apports du ruisseau du Tillet dans l'explication de la concentration en COD des stations aval du réseau (Lepic et Aquarium). La forte augmentation de la concentration en matières organiques des biofilms de la station Aquarium en juin 2009 est un nouvel argument en faveur de l'existence d'un apport non répertorié en aval de la station Lepic.

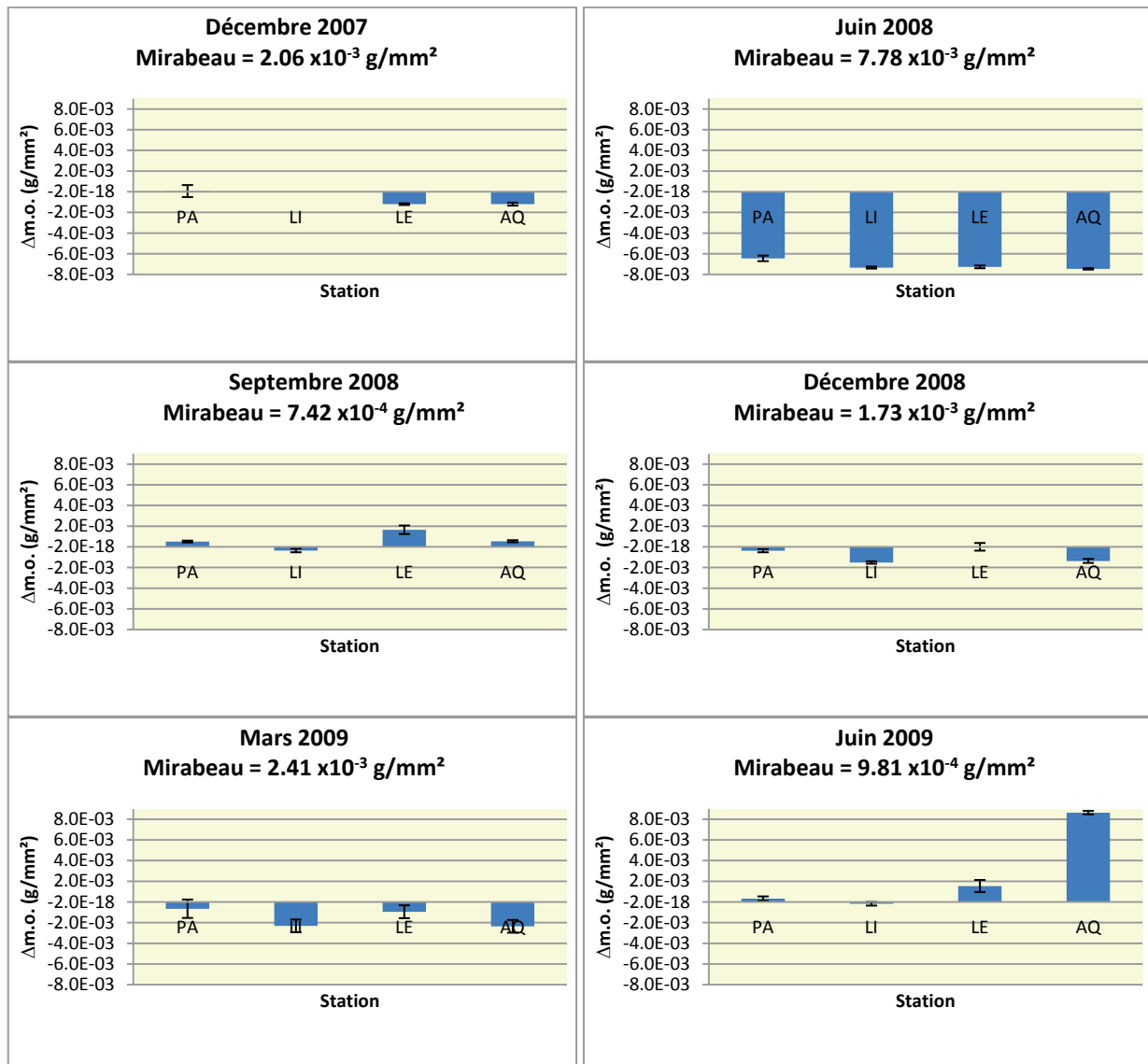


Figure 100 : Comparaison des stations sur la base des écarts de la concentration des biofilms en matières organiques par rapport à la valeur de la station Mirabeau, prise pour référence (Valeur indiquée dans l'entête de chaque figure). Pour chacune des stations, les valeurs des écarts au sein d'une même campagne sont représentées par leur médiane. Les barres d'erreurs correspondent au MAD.

Codes des stations : PA : Parking ; LI : Liège, LE : Lepic, AQ : Aquarium.

Pour aller plus loin dans l'analyse nous avons choisi d'exprimer la concentration en matières organiques par référence au poids sec des biofilms. La Figure 101 montre que, de ce point de vue, les stations se séparent en 2 groupes. Le premier réunit les stations Parking et Liège pour lesquelles la fraction organique est du même ordre de grandeur que dans les biofilms échantillonnés en amont dans la station de référence. Pour chacune de ces deux stations, les différences entre les campagnes sont parfois significatives mais restent dans tous les cas inférieures à $\pm 2.5\%$.

Le deuxième groupe réunit les stations Lepic et Aquarium qui sont caractérisées par des proportions de matières organiques nettement plus importantes que celle des biofilms de la station de référence. Les écarts sont toujours significatifs (Annexe 3 et Annexe 4) quelle que soit la campagne et compris entre 3 et 35%. Les plus fortes différences sont observées en période hivernale, et les plus faibles en début d'automne. Les écarts mesurés au printemps se rapprochent de ceux de la période estivale avec des valeurs intermédiaires. Ces résultats montrent en fait qu'il existe une relation entre la proportion de matière organique des biofilms et l'arrivée dans le réseau des eaux du Tillet. Cette relation est à rapprocher des apports de COD issus de ce cours d'eau mis en évidence précédemment (§ 6.1.3.2), apports à partir desquels le développement des bactéries au sein des biofilms serait stimulé.

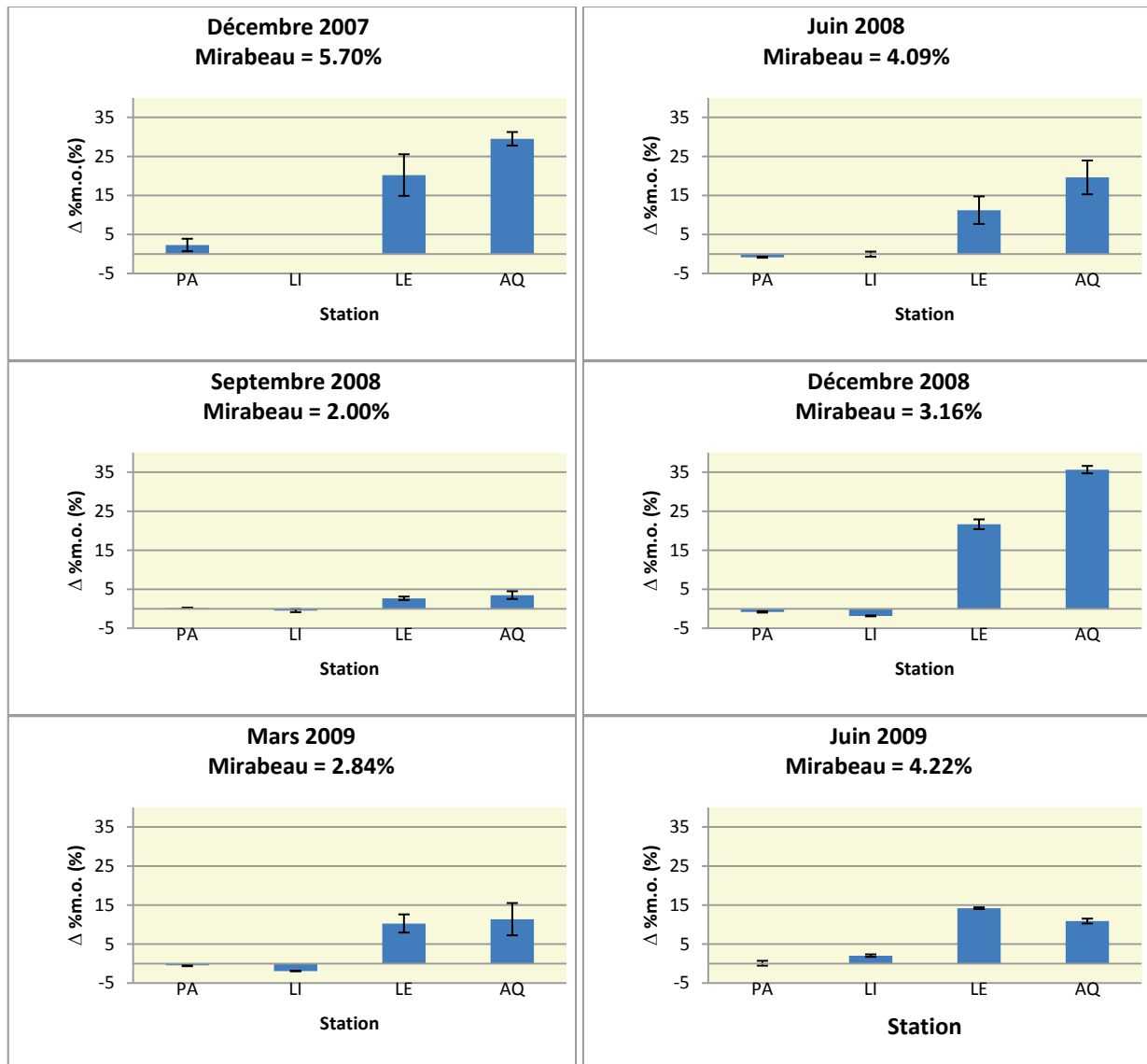


Figure 101 : Comparaison des stations sur la base des écarts de la proportion des matières organiques vis-à-vis des valeurs de la station Mirabeau, prise pour référence (Valeur indiquée dans l'entête de chaque figure). Pour chacune des stations, les valeurs des écarts au sein d'une même campagne sont représentées par leur médiane. Les barres d'erreurs correspondent au MAD.
Codes des stations : PA : Parking ; LI : Liège, LE : Lepic, AQ : Aquarium.

Ces résultats montrent que les arrivées d'eaux thermales n'ont pas d'effet marqué sur le développement global des biofilms, que ce soit en termes de poids sec et de concentration ou de pourcentage de matières organiques. Dans le réseau étudié, cette dernière caractéristique des biofilms est nettement contrôlée par les apports nutritifs issus du ruisseau du Tillet.

6.1.4.2 Concentrations en bactéries_{totales} et en bactéries_{cultivables}

Le second descripteur utilisé pour évaluer l'impact des apports d'eaux thermales sur le développement des biofilms est la concentration en bactéries_{totales} exprimée dans la Figure 102, comme pour les autres descripteurs, par référence aux valeurs de la station Mirabeau.

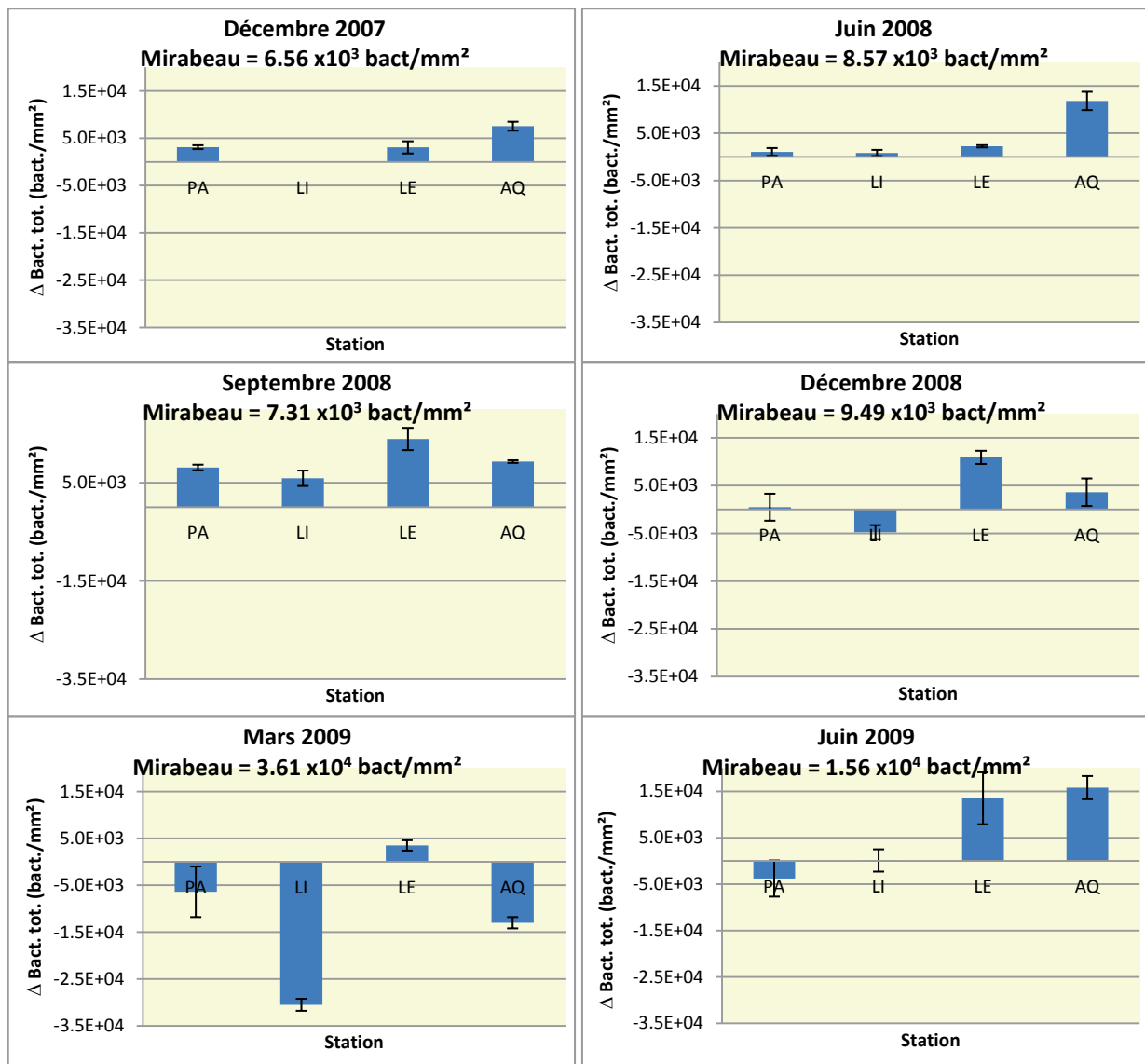


Figure 102 : Comparaison des stations sur la base des écarts de la concentration en bactéries_{totales} vis-à-vis des valeurs de la station Mirabeau, prise pour référence (Valeur indiquée dans l'entête de chaque figure). Pour chacune des stations, les valeurs des écarts au sein d'une même campagne sont représentées par leur médiane. Les barres d'erreurs correspondent au MAD.

Codes des stations : PA : Parking ; LI : Liège, LE : Lepic, AQ : Aquarium.

Globalement et si l'on fait abstraction de la campagne de mars 2009, les résultats ne montrent qu'une tendance pas toujours bien marquée, à l'accroissement de la concentration bactérienne des biofilms d'amont en aval. Dans le détail, il apparaît que l'apport des eaux thermales ne change pas de façon manifeste la concentration bactérienne. L'apport des eaux du Tillet semble, par contre, être plus significatif de ce point de vue.

On note par ailleurs que la station Liège est associée à des valeurs très faibles et même négatives lors de deux campagnes (décembre 2008 et mars 2009). Il n'est pas étonnant que l'importance de la vitesse de l'eau dans cette station, gêne le développement bactérien.

Les remarques précédentes sont applicables aux résultats concernant la fraction cultivable de la communauté bactérienne : les changements imposés par l'apport d'eaux thermales n'ont pas d'influence marquée sur la concentration en bactéries_{cultivables} (Figure 103). Les plus fortes augmentations sont observées lors de la campagne de septembre 2008. Il est à noter que c'est au niveau de la station Lepic qu'elles sont généralement les plus significatives, station dans laquelle la fraction organique du biofilm est effectivement la plus importante.

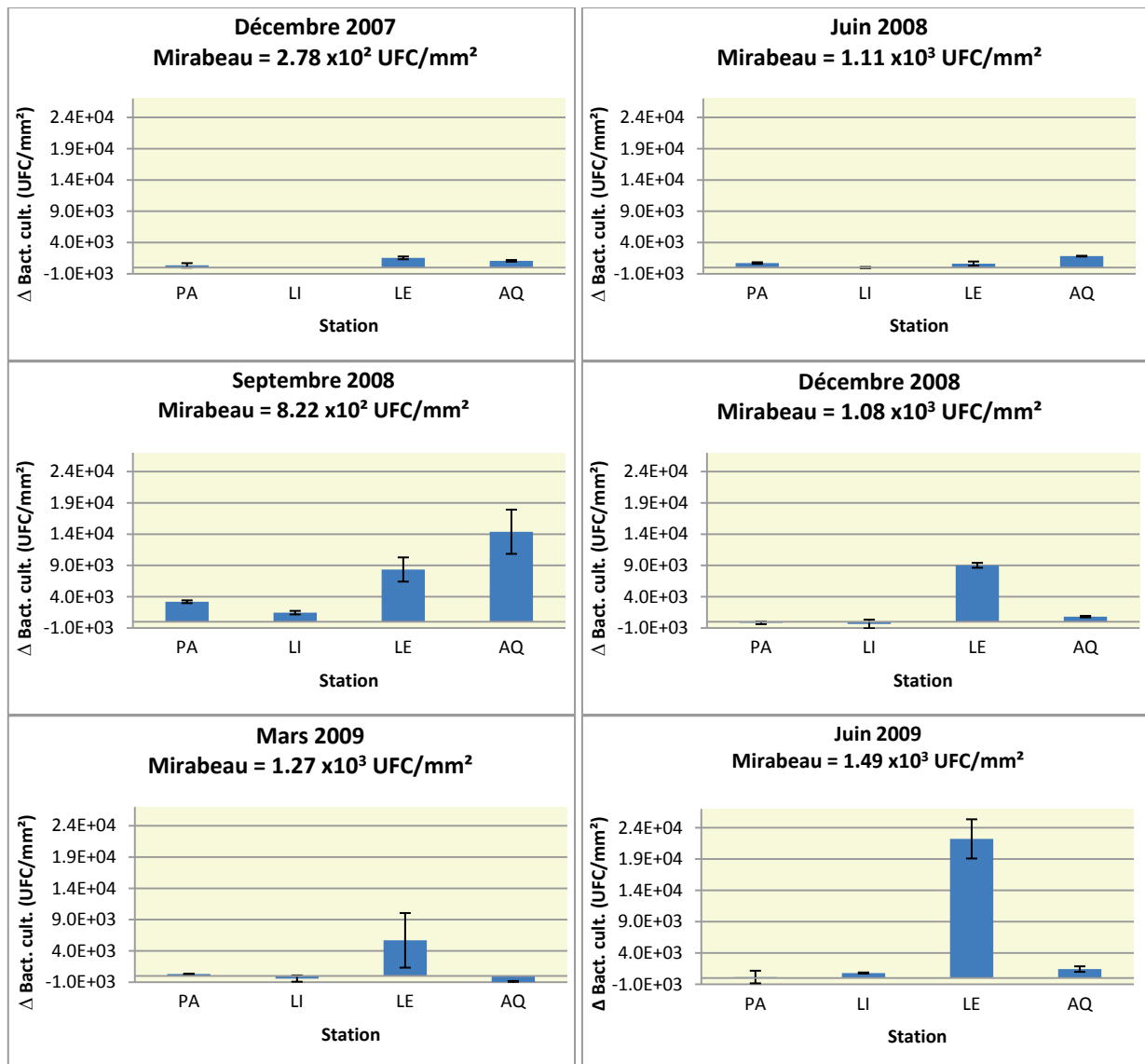


Figure 103 : Comparaison des stations sur la base des écarts de la concentration en bactéries_{cultivables} vis-à-vis des valeurs de la station Mirabeau, prise pour référence (Valeur indiquée dans l'entête de chaque figure). Pour chacune des stations, les valeurs des écarts au sein d'une même campagne sont représentées par leur médiane. Les barres d'erreurs correspondent au MAD.

Codes des stations : PA : Parking ; LI : Liège, LE : Lépici, AQ : Aquarium.

Les campagnes de prélèvements effectuées à la station Mirabeau, c'est-à-dire en amont des apports thermiques, font apparaître un pourcentage de bactéries_{cultivables} de moins de 10%. Cette proportion tombe à 3.42% et 3.50% au cours des campagnes de décembre 2007 et mars 2009. Ces valeurs restent fortes par rapport à celles qui sont généralement acceptées (1 %) pour la population des bactéries libres de la colonne d'eau.

Les apports d'eaux thermiques et les modifications physico-chimiques correspondantes, semblent donc ne pas avoir d'influence significative sur l'importance de la fraction cultivable des biofilms du réseau (Figure 104).

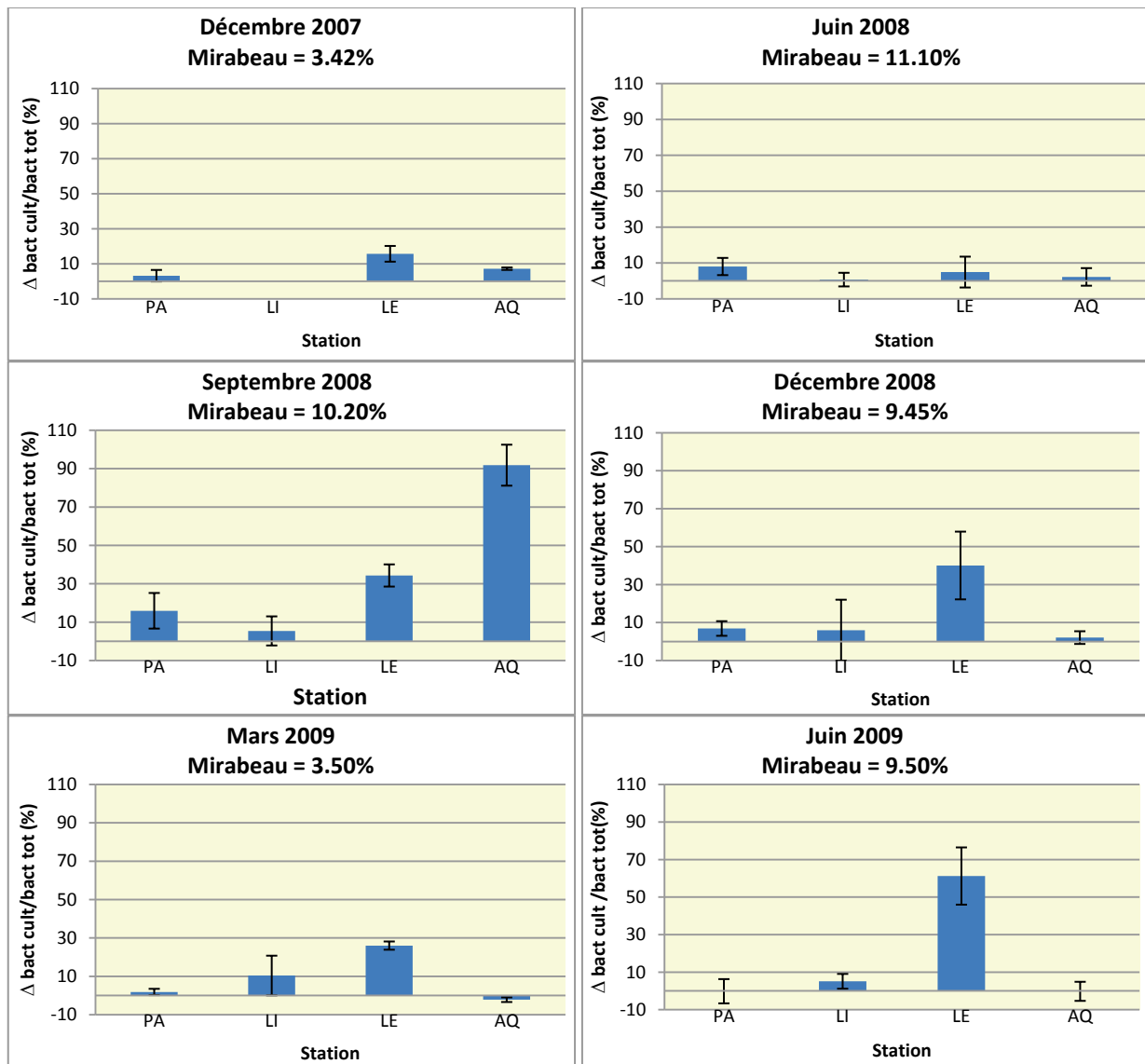


Figure 104 : Comparaison des stations sur la base des écarts du pourcentage de bactéries_{cultivables} (bactéries_{cultivables}/bactéries_{totales}) vis-à-vis des valeurs de la station Mirabeau, prise pour référence (Valeur indiquée dans l'entête de chaque figure). Pour chacune des stations, les valeurs des écarts au sein d'une même campagne sont représentées par leur médiane. Les barres d'erreurs correspondent au MAD.

Codes des stations : PA : Parking ; LI : Liège, LE : Lepic, AQ : Aquarium.

La confluence avec le Tillet, qui s'accompagne d'une hausse de la fraction organique, se traduit par une augmentation significative et ponctuelle de la concentration des bactéries_{cultivables}. Le prolongement de cet effet jusqu'à l'exutoire du lac n'est observé que pour une seule campagne (septembre 2008).

6.1.4.3 Concentrations de *Lpn* dans les biofilms

Comme indiqué plus haut, les rejets d'eaux thermiques sont chargés en permanence par des légionelles et plus spécifiquement par des représentants de l'espèce *Legionella pneumophila*.

Les données présentées ici ont pour but d'étudier l'incidence de ces apports sur la présence de *Lpn* dans les biofilms du milieu récepteur, à partir des points de confluence et, en aval, tout le long du réseau.

Globalement l'enrichissement des biofilms en *Lpn* conséquents aux apports d'eaux thermales n'est pas très marqué comme le montre l'examen de la Figure 105.

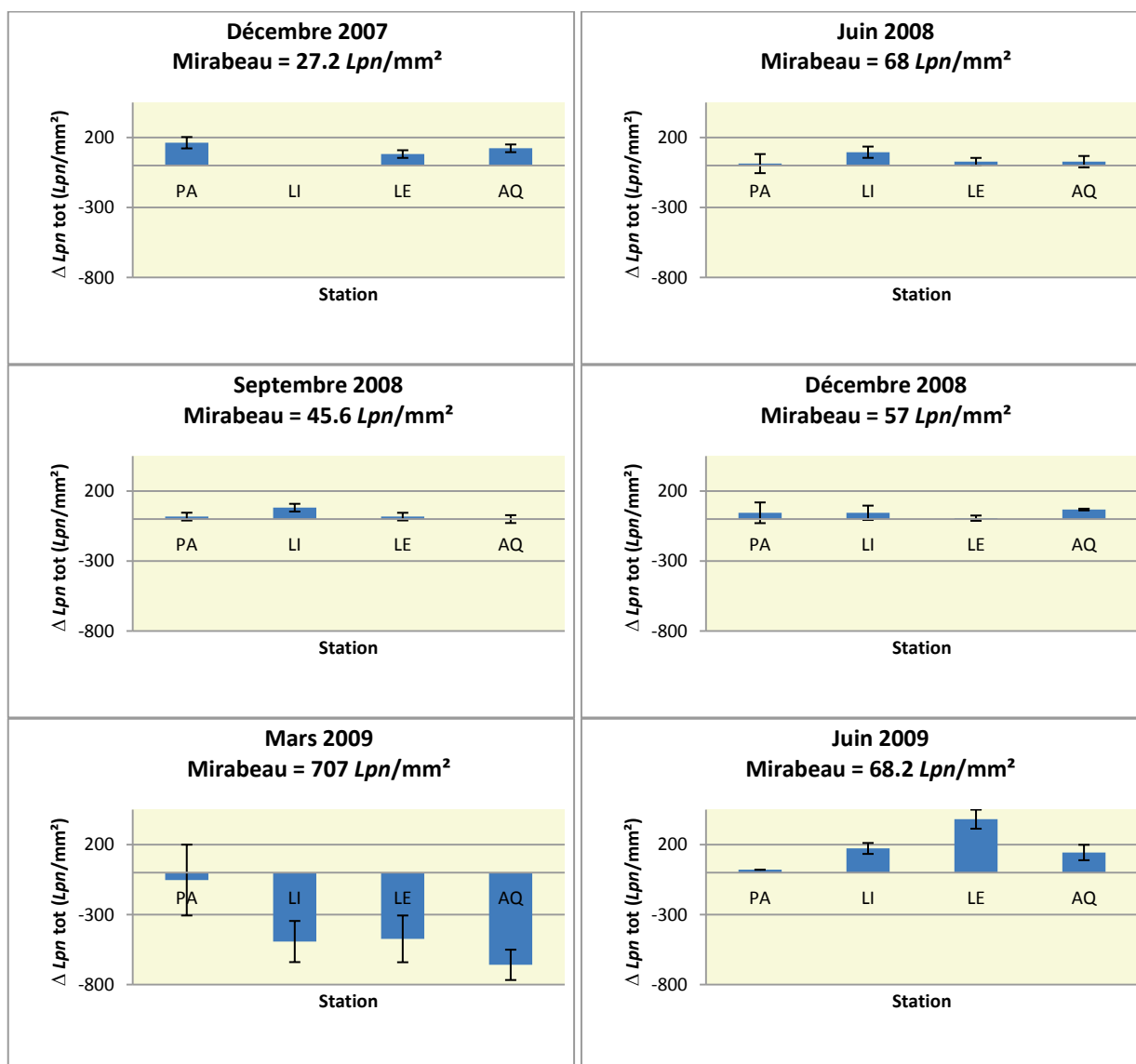


Figure 105 : Comparaison des stations sur la base des écarts de la concentration de *Lpn* vis-à-vis des valeurs de la station Mirabeau, prise pour référence (Valeur indiquée dans l'entête de chaque figure). Pour chacune des stations, les valeurs des écarts au sein d'une même campagne sont représentées par leur médiane. Les barres d'erreurs correspondent au MAD.

Codes des stations : PA : Parking ; LI : Liège, LE : Lepic, AQ : Aquarium.

Le point le plus constant du point de vue de l'enrichissement en *Lpn* est la station Liège. Les effets des autres points d'apport, de la source thermique en amont de la station Parking et du Tillet en amont de la station Lepic, ne sont que ponctuellement manifestes. Les apports de *Lpn* par les eaux thermales et les eaux de la bêche n'apparaissent pas avoir d'effet durable sur la concentration de cette bactérie dans les biofilms. Ces résultats suggèrent l'existence dans les cours d'eau successifs de conditions défavorables à la multiplication des légionelles. Ces conditions peuvent être rattachées à des processus dits d'autoépuration puisqu'ils aboutissent à la réduction de la charge des biofilms en *Lpn*.

Seule la campagne de juin 2009 fait apparaître ce qui semble être un effet cumulatif des apports successifs de *Lpn*. Il est à noter cependant que la concentration diminue de nouveau en aval au niveau de la station Aquarium, ce qui viendrait confirmer l'existence de mécanismes d'autoépuration.

La campagne de mars 2009, se distingue des autres par le fait que les parties du réseau situées en aval des points d'apport sont moins chargées en *Lpn* que la station de référence.

Les résultats précédents font donc apparaître un enrichissement effectif des biofilms en *Lpn* en liaison avec les apports des sources thermales, ceux du rejet de la bêche et ceux de la confluence du Tillet. Il apparaît en outre qu'aucun de ces apports n'est prépondérant vis-à-vis des autres. L'effet d'enrichissement reste très localisé ce qui pourrait être la manifestation de processus naturels d'autoépuration.

Les apports en *Lpn* spécifiques aux eaux thermales et à la bêche apparaissent de façon plus manifeste lorsque l'on considère les proportions de *Lpn* au sein des communautés bactériennes avec le rapport $Lpn_{\text{totales}}/bactéries_{\text{totales}}$ (Figure 106). L'enrichissement des biofilms lié aux apports du Tillet semble donc concerner l'ensemble des bactéries et non pas spécifiquement *Lpn*.

On note que les proportions de *Lpn* au niveau de la station Aquarium sont toujours de l'ordre de grandeur, voire inférieures à celles de la station de référence, observation en faveur de l'existence des processus d'autoépuration évoqués plus haut.

Pour la plupart des campagnes, *Lpn* représente moins de 0.7% de l'ensemble des bactéries. Leur proportion atteint tout de même 2% lors de la campagne de mars 2009. Leur concentration était alors dix fois plus élevée que lors des autres campagnes.

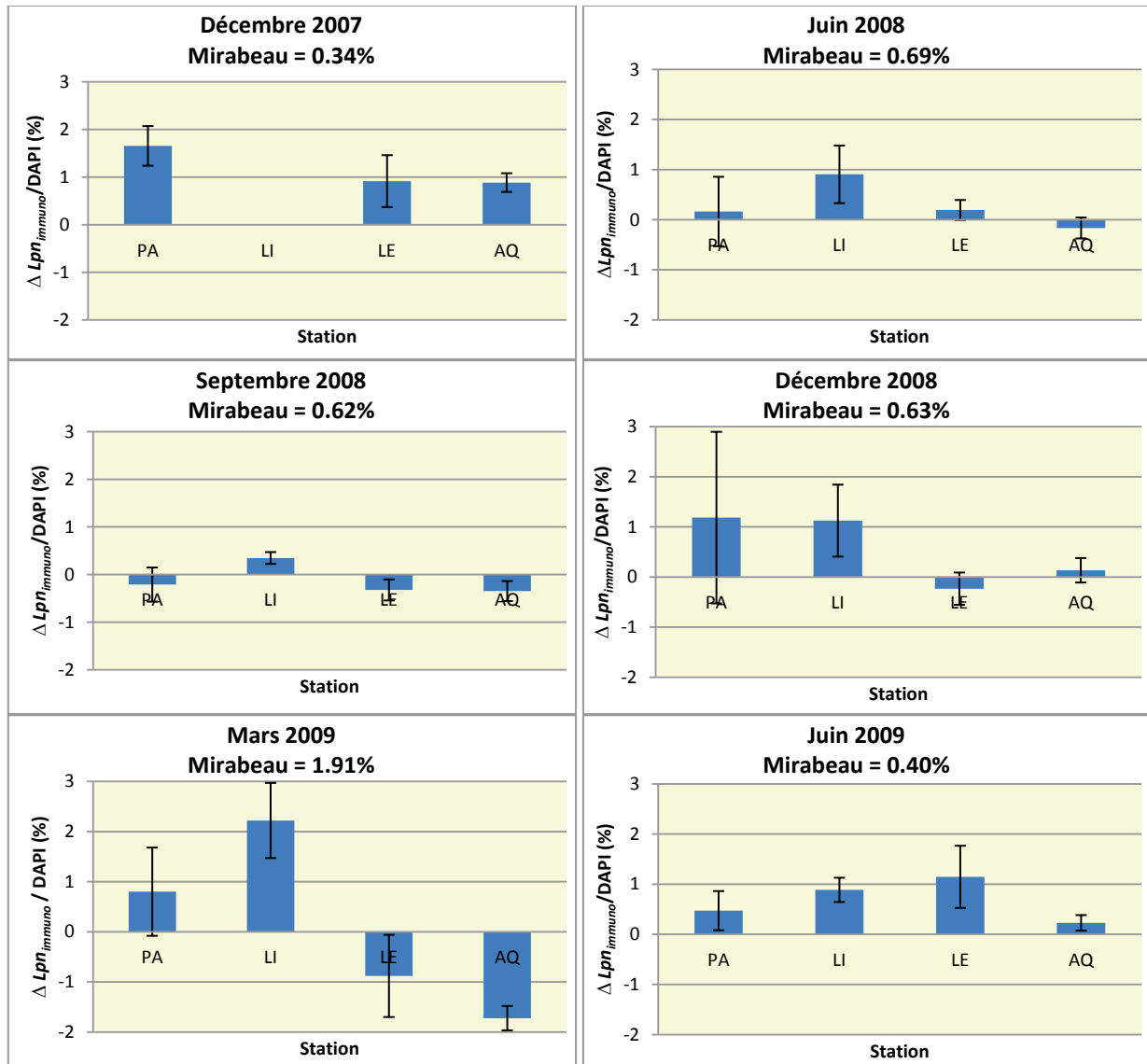


Figure 106 : Comparaison des stations sur la base des écarts des proportions de *Lpn* vis-à-vis des valeurs de la station Mirabeau, prise pour référence (Valeur indiquée dans l'entête de chaque figure). Pour chacune des stations, les valeurs des écarts au sein d'une même campagne sont représentées par leur médiane. Les barres d'erreurs correspondent au MAD.

Codes des stations : PA : Parking ; LI : Liège, LE : Lépici, AQ : Aquarium.

S'agissant d'une bactérie potentiellement pathogène, ces proportions nous apparaissent relativement fortes, voire très fortes dans les circonstances de la campagne de mars 2009, par exemple. Ces valeurs subissent cependant de fortes diminutions au niveau des stations les plus en aval sous l'effet de processus de régulation.

Les dénombrements de *Lpn* par la technique FISH, conduisent aux mêmes conclusions d'autant plus que les concentrations en Lpn_{FISH} sont supérieures aux concentrations en $Lpn_{totales}$. Les hypothèses émises lors du premier volet de l'étude au sujet de la surestimation de la présence de *Lpn* par la méthode FISH restent valables dans le cas du réseau aixois. De ce fait, les proportions calculées à partir de la technique immunologique sont probablement plus réalistes que celles basées sur la technique FISH.

Aucune forme cultivable de *Lpn* n'a été détectée dans les échantillons de la station Mirabeau, quelle que soit la campagne (Figure 107). Les biofilms des autres stations, quant à eux, contiennent des *Lpn* à l'état cultivable, mais à une concentration qui reste faible, généralement inférieure à une colonie par mm² de biofilm. Il est à noter que les concentrations mesurées lors des 3 campagnes d'hiver et de début de printemps sont inférieures à celles des campagnes d'été et de début d'automne. Le sérotype 1 est également dominant dans ce volet de l'étude (83.5% des colonies, réparties sur l'ensemble des stations). Ce résultat est compatible avec des apports de *Lpn* avec les eaux thermales, car les sérotypes 3 et 1 sont dominants dans les eaux thermales aixoises (Bornstein, *et al.*, 1989, Molmeret, *et al.*, 2001)

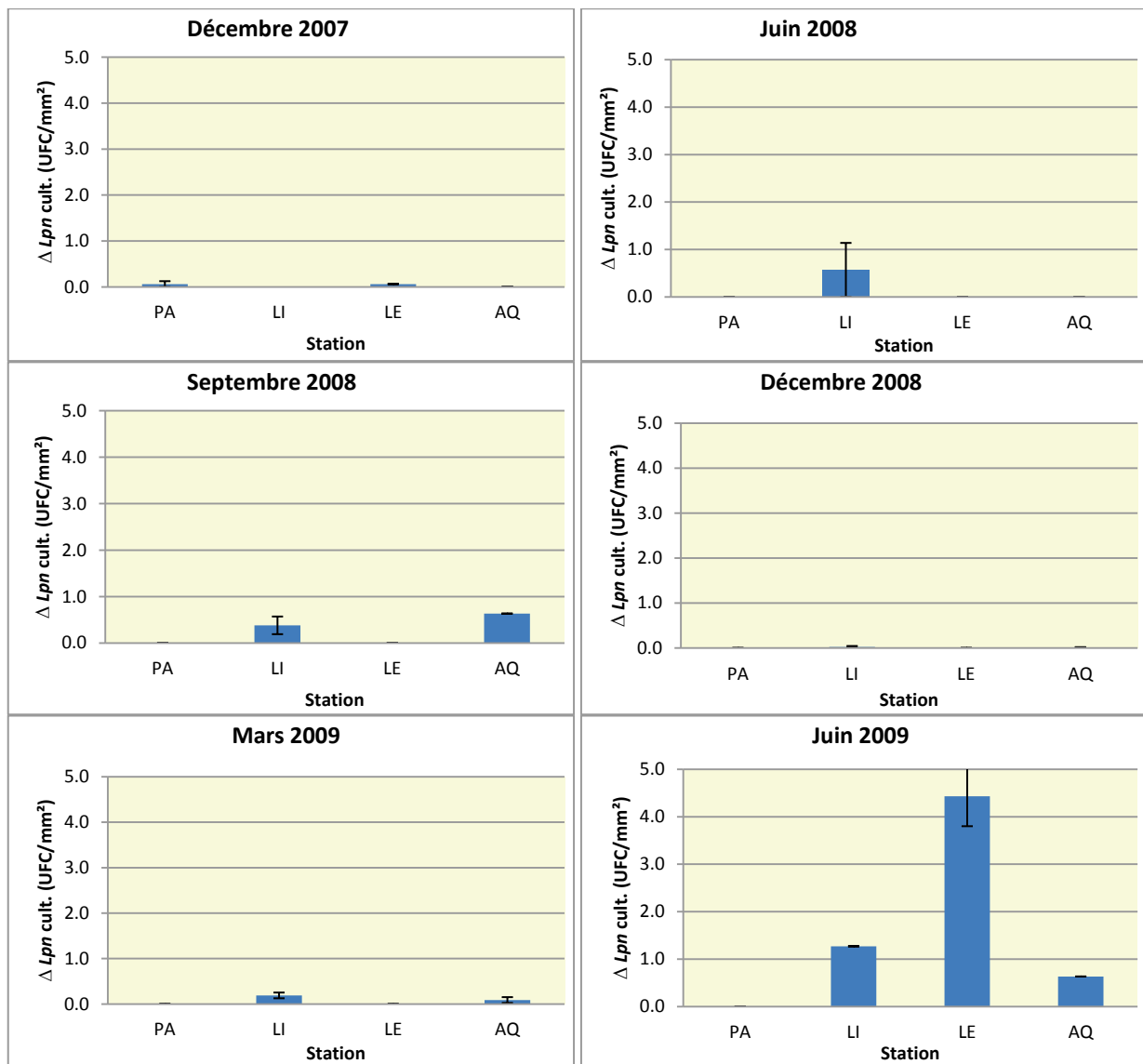


Figure 107 : Comparaison des stations sur la base des écarts des concentrations de *Lpn* cultivables vis-à-vis des valeurs de la station Mirabeau, prise pour référence. Pour chacune des stations, les valeurs des écarts au sein d'une même campagne sont représentées par leur médiane. Les barres d'erreurs correspondent au MAD.

Codes des stations : PA : Parking ; LI : Liège, LE : Lepic, AQ : Aquarium.

Ce sont les biofilms de la station Liège qui présentent de façon la plus constante des formes cultivables de *Lpn*. Les valeurs les plus importantes ont été observées, par contre, au niveau de la station Lepic.

Les valeurs enregistrées au niveau de la station Aquarium sont nulles ou très faibles. Compte tenu de l'irrégularité des échantillons positifs et de leur distribution tout au long du cours d'eau, l'effet de processus de régulation (autoépuration) n'apparaît pas clairement à travers ce descripteur.

Les données acquises montrent que la forme cultivable de *Lpn* ne constituerait qu'une infime partie des *Lpn* du biofilm : moins de 1%. Elles font également apparaître un effet saisonnier : les proportions de *Lpn*_{cultivables} sont comprises entre 0.3% et 1% durant les campagnes estivales et moins de 0.2% durant les campagnes hivernales. *Lpn* présenterait donc moins de formes cultivables que le reste des bactéries constituant les biofilms.

6.1.4.4 Evolution du groupe "*Pseudomonas* et bactéries apparentées", recherche d'un antagonisme avec *Lpn*

Certaines bactéries sont capables de produire des toxines qui inhibent le développement d'autres bactéries (bactériocines), comme *Staphylococcus warneii* qui produit un peptide inhibant *Lpn* (Héchar, *et al.*, 2005), ou de nombreuses espèces d'*Aeromonas* (Toze, *et al.*, 1994), ou encore *P. aeruginosa* (Declerck, *et al.*, 2005).

Des mesures préliminaires effectuées dans les biofilms des sources thermales aixoises ont montré l'existence possible d'un antagonisme entre *Lpn* d'une part, et d'autre part, le groupe "*Pseudomonas* et bactéries apparentées" (Baules & Laurent, 2006). C'est dans le prolongement de cette observation que nous avons choisi de comparer le développement de *Lpn* et de ce groupe de bactéries dans les biofilms de l'ensemble du réseau aixois.

Deux techniques ont été mises en œuvre pour suivre l'évolution du groupe "*Pseudomonas* et bactéries apparentées" : la technique FISH et les dénombrements par culture. Les résultats de la technique FISH, montrent que l'effet des eaux thermales sur les concentrations de ces bactéries est très variable d'une campagne à l'autre (Figure 108).

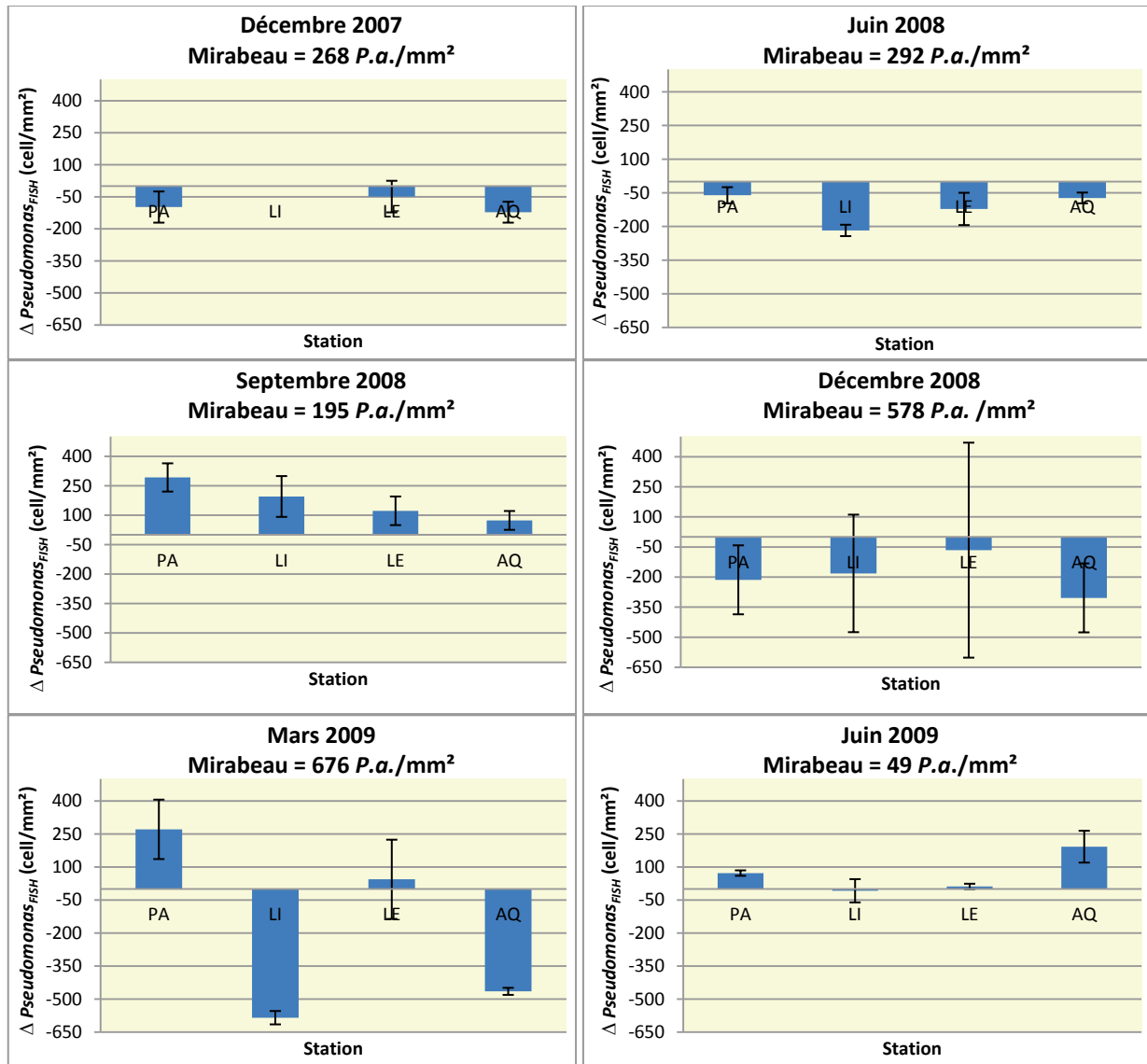


Figure 108 : Comparaison des stations sur la base des écarts des concentrations des bactéries du groupe "Pseudomonas et bactéries apparentées" par référence aux valeurs de la station Mirabeau, (Valeur indiquée dans l'entête de chaque figure). Pour chacune des stations, les valeurs des écarts au sein d'une même campagne sont représentées par leur médiane. Les barres d'erreurs correspondent au MAD.

Codes des stations : PA : Parking ; LI : Liège, LE : Lépici, AQ : Aquarium.

La station Parking a présenté une augmentation significative (Annexe 3) de la concentration de "Pseudomonas et des bactéries apparentées" uniquement lors des 3 premières campagnes (décembre 2007, juin et septembre 2008). L'eau provenant des sources thermales est donc susceptible d'apporter des bactéries rattachées à ce groupe, mais sans corrélation apparente avec la saison.

A la station Liège, la concentration de "Pseudomonas_{FISH} et des bactéries apparentées" était inférieure à celle de la station Mirabeau, uniquement lors des campagnes de juin 2008 et de mars 2009. Dans les autres cas, la différence observée n'était pas significative. L'apport des eaux provenant de l'établissement thermal (rejets) ou les conditions de développement des biofilms à cette station ont donc tendance à limiter la présence de "Pseudomonas et des bactéries apparentées", même en présence d'apports provenant des sources (observables à la station Parking).

Les biofilms de la station Lepic, à l'aval du point de confluence avec les eaux du Tillet, ne permettent pas, non plus, de mettre en évidence un impact de cette arrivée d'eau sur la concentration de "*Pseudomonas* et des bactéries apparentées". Seules les campagnes de juin et de septembre 2008, correspondent à une variation significative de leur concentration par rapport à la station de référence, mais cette différence va dans le sens d'un appauvrissement en juin et d'un enrichissement en septembre 2008.

A l'exception des campagnes de juin 2008 et de septembre 2009, la concentration des bactéries du groupe "*Pseudomonas* et des bactéries apparentées" à la station Aquarium est inférieure à celle de la station Mirabeau.

Pour la majorité du temps, les stations sont moins chargées que la station de référence. De plus, il n'y a guère qu'au niveau de la station Parking qu'un lien peut être fait entre un apport de bactéries du groupe "*Pseudomonas* et des bactéries apparentées" et un apport d'eaux thermales.

Les arrivées des eaux thermales associées au facteur saisonnier ne suffisent pas à expliquer les variations de concentration des bactéries de ce groupe le long du réseau.

Comme pour *Lpn* nous nous sommes intéressés à l'évolution des proportions que représentent ces concentrations dans la communauté bactérienne des biofilms. A la station Mirabeau, l'importance relative des bactéries du groupe "*Pseudomonas* et bactéries apparentées" est légèrement plus grande que celle de *Lpn*.

La diminution des proportions des bactéries de ce groupe est quasi systématique au niveau de la station Aquarium. Une baisse similaire est observée au niveau des 3 autres stations lors de campagnes de Décembre 2007 et de Juin 2008. Les eaux provenant des sources thermales apportent donc moins de "*Pseudomonas* et de bactéries apparentées" que de bactéries_{totales}. Il semble qu'il en soit de même pour tous les autres apports bactériens le long du cours d'eau.

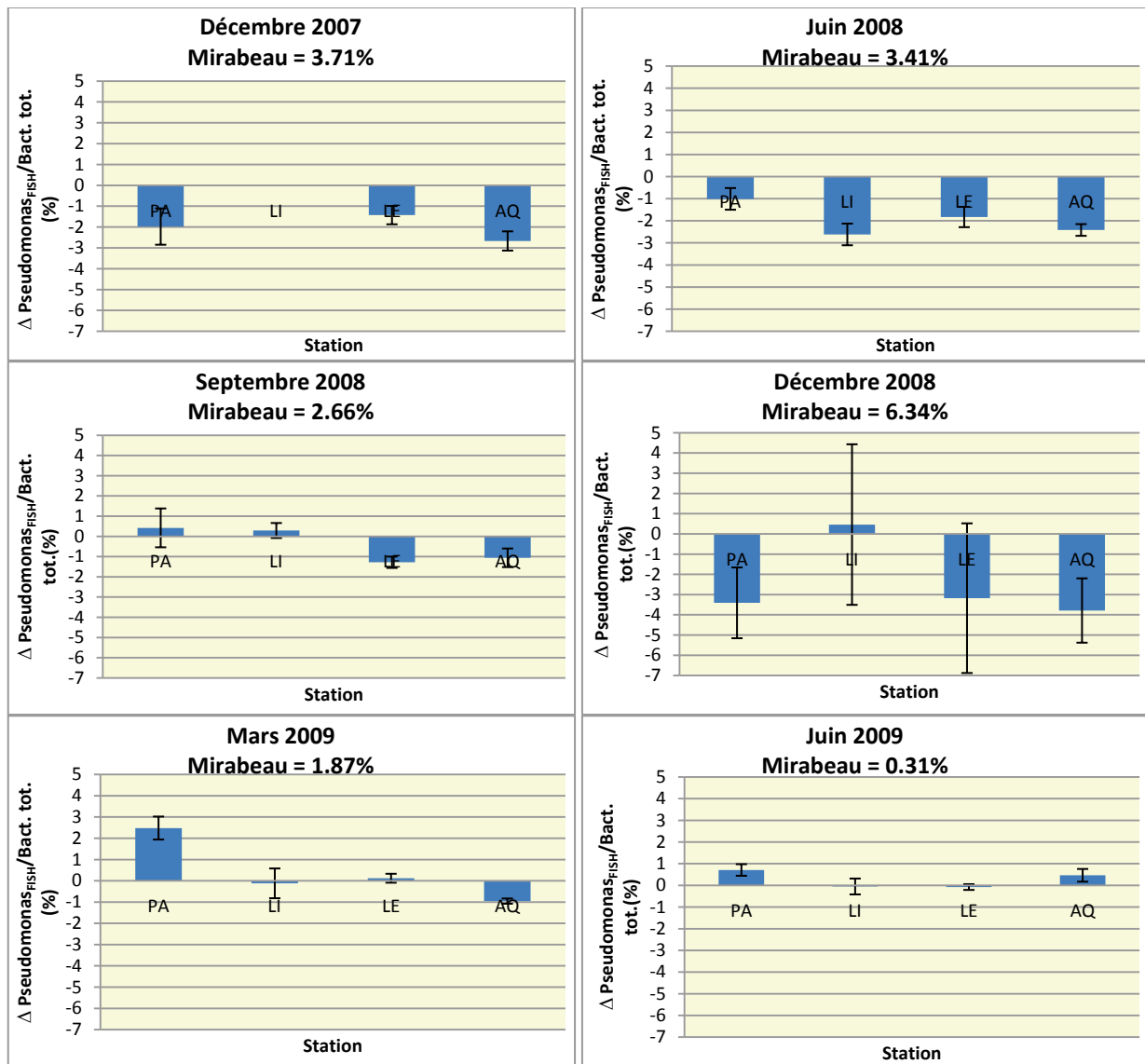


Figure 109 : Comparaison des stations sur la base des écarts des proportions des bactéries du groupe "*Pseudomonas* et bactéries apparentées" vis-à-vis des valeurs de la station Mirabeau, prise pour référence (Valeur indiquée dans l'entête de chaque figure). Pour chacune des stations, les valeurs des écarts au sein d'une même campagne sont représentées par leur médiane. Les barres d'erreurs correspondent au MAD.
Codes des stations : PA : Parking ; LI : Liège, LE : Lepic, AQ : Aquarium.

Les changements de milieu engendrés par les affluences, celle du ruisseau du Tillet comprise, semblent avoir tendance à défavoriser la présence de bactéries du groupe "*Pseudomonas* et bactéries apparentées" au sein des communautés des biofilms.

Notre intérêt s'est également porté sur les formes cultivables des bactéries de ce groupe présentes dans les biofilms. Comme pour les concentrations mesurées par la méthode FISH, l'évolution le long du réseau est très variable selon les campagnes (Figure 110).

La distribution de ces bactéries le long du réseau peut présenter des profils opposés d'une campagne à une autre comme l'indiquent les résultats des campagnes de juin et de septembre 2008.

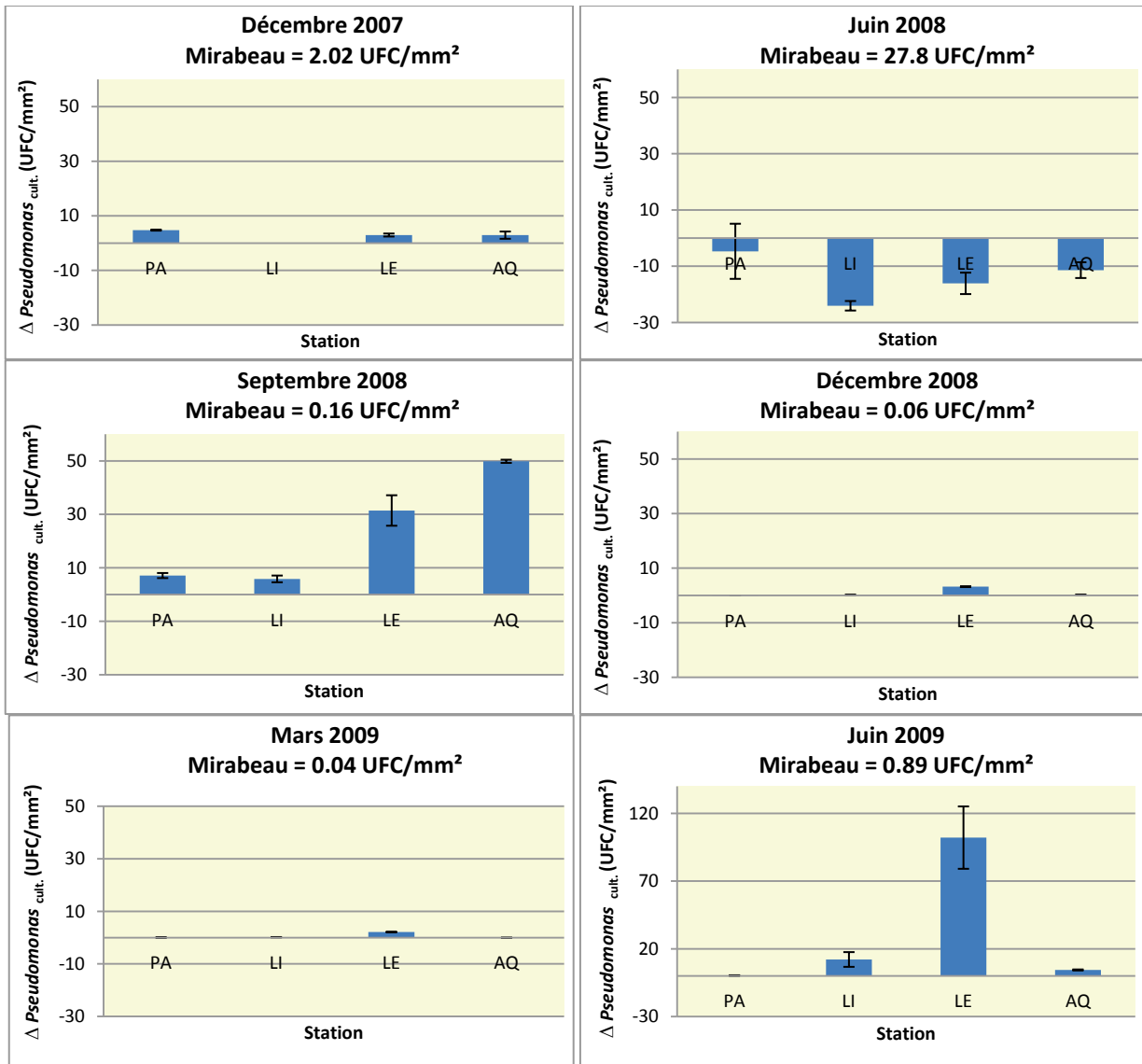


Figure 110 : Comparaison des stations sur la base des écarts des concentrations de "*Pseudomonas*_{cultivables} et des bactéries apparentées" vis-à-vis des valeurs de la station Mirabeau, prise pour référence (Valeur indiquée dans l'entête de chaque figure). Pour chacune des stations, les valeurs des écarts au sein d'une même campagne sont représentées par leur médiane. Les barres d'erreurs correspondent au MAD. Codes des stations : PA : Parking ; LI : Liège, LE : Lépici, AQ : Aquarium.

Les apports des sources thermales influencent leur concentration qu'uniquement durant les campagnes de décembre 2007 et de septembre 2008. Dans les deux cas, il en résulte une augmentation de la concentration bactérienne par rapport aux valeurs à la station Mirabeau.

Au niveau de la station Liège, la différence par rapport à la concentration de Mirabeau est significative pour toutes les campagnes à l'exception de celle de décembre 2008. Il s'agit d'une baisse de la concentration pour la campagne de juin 2008 et d'une augmentation en septembre 2008, mars et juin 2009.

La station Lépici montre également une augmentation de la concentration de "*Pseudomonas*_{cultivables} et des bactéries apparentées" au cours des 4 dernières campagnes.

Enfin, la station Aquarium montre une augmentation significative en décembre 2007, septembre 2008, mars et juin 2009, mais une baisse en juin 2008.

Dans leur ensemble les résultats montrent que les concentrations de "*Pseudomonas*_{cultivables} et des bactéries apparentées" sont peu ou pas affectées par les apports des eaux thermales. L'affluence du ruisseau du Tillet, par contre, est associée lors de deux campagnes à de fortes augmentations de ce descripteur.

L'expression de l'abondance des formes cultivables des bactéries du groupe "*Pseudomonas* et bactéries apparentées" relativement à l'ensemble des cellules du même groupe (rapport "*Pseudomonas*_{cultivables} et bactéries apparentées" / "*Pseudomonas*_{FISH} et bactéries apparentées", Figure 111) ne modifie pas fondamentalement la conclusion précédente: les proportions de bactéries_{cultivables} au sein des biofilms ne sont pas significativement altérées du fait des apports des sources thermales. Pour les deux campagnes citées précédemment, une forte augmentation du pourcentage de bactéries du groupe "*Pseudomonas*_{cultivables} et bactéries apparentées" est observée en aval de la confluence avec le Tillet.

Il est à noter que l'ensemble des bactéries dénombrées au niveau des stations Liège et Lepic durant la campagne de juin 2009, étaient cultivables.

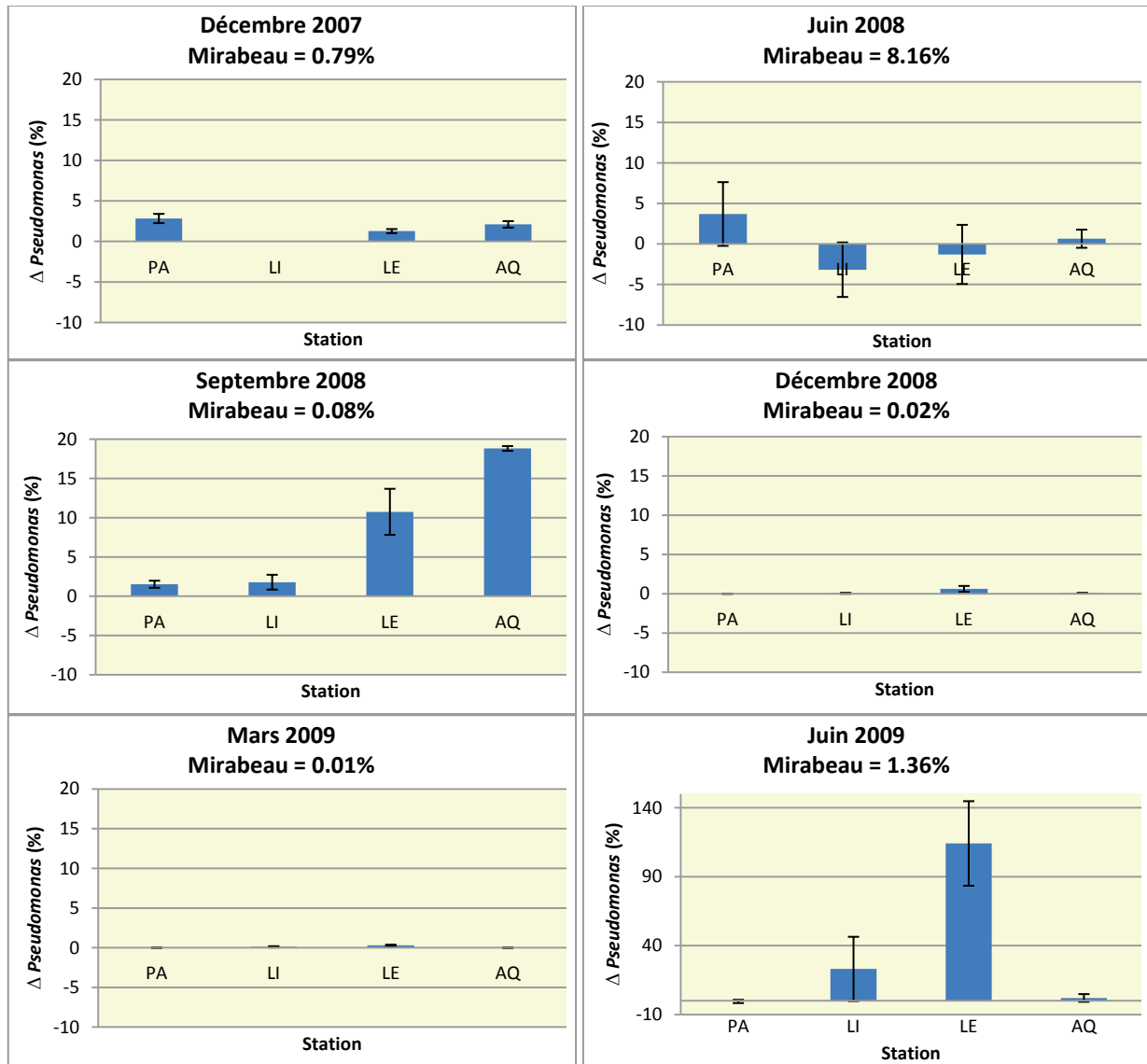


Figure 111 : Comparaison des stations sur la base des écarts des proportions de bactéries du groupe "*Pseudomonas*_{cultivables} et bactéries apparentées" vis-à-vis des valeurs de la station Mirabeau, prise pour référence (Valeur indiquée dans l'entête de chaque figure). Pour chacune des stations, les valeurs des écarts au sein d'une même campagne sont représentées par leur médiane. Les barres d'erreurs correspondent au MAD.

Codes des stations : PA : Parking ; LI : Liège, LE : Lepic, AQ : Aquarium.

Dans les paragraphes qui suivent, nous avons cherché à partir de notre matrice de données, l'éventuelle manifestation d'un antagonisme entre les bactéries du groupe "*Pseudomonas* et bactéries apparentées" et *Lpn*, en considérant dans un 1^{er} temps l'ensemble des cellules de chacune des deux groupes, puis leurs formes cultivables.

L'analyse a tout d'abord été conduite sur la matrice entière (toutes stations et toutes campagnes confondues). Nous l'avons ensuite réitérée en comparant d'une part les campagnes, toutes stations confondues et d'autre part les stations, toutes campagnes confondues (Annexe 5).

Lorsque l'on considère les formes cultivables des bactéries des deux groupes, que ce soit en valeur absolue ou en valeur relative (pourcentage par rapport à la population totale de la bactérie considérée), sur l'ensemble de la matrice, aucun effet antagoniste n'est observé. Pour deux des jeux de données de la matrice partitionnée (ensemble des mesures effectuées durant la campagne de juin 2009 (Figure 112) et station Liège, toutes campagnes confondues, Figure 113), les formes cultivables des bactéries des deux groupes apparaissent, au contraire, corrélées positivement.

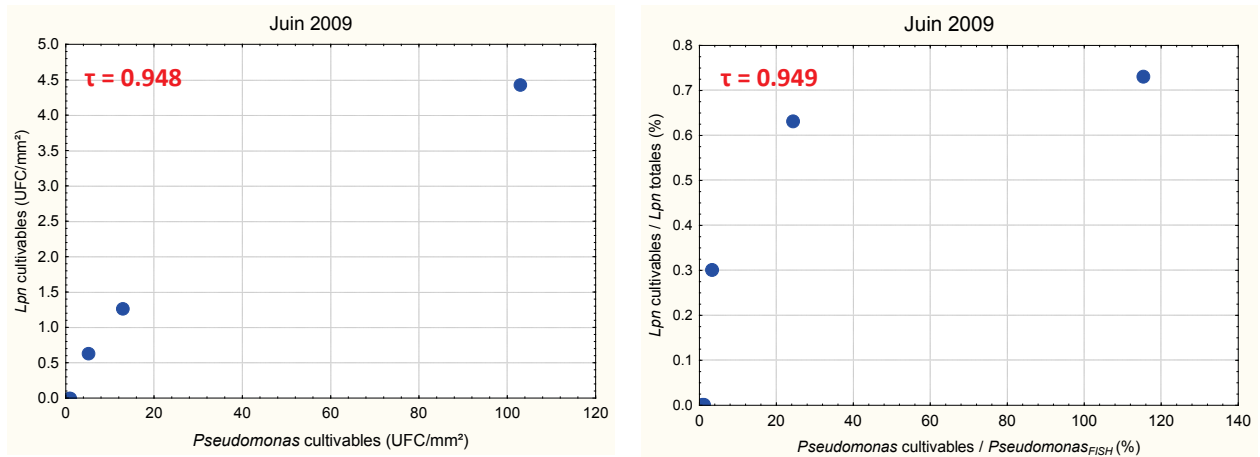


Figure 112 : Evolution des concentrations et des proportions de *Lpn*_{cultivables} ($Lpn_{\text{cultivables}}/Lpn_{\text{totales}}$) en fonction des concentrations et des proportions des bactéries du groupe "*Pseudomonas*_{cultivables} et bactéries apparentées" ("*Pseudomonas*_{cultivables} et bactéries apparentées"/"*Pseudomonas*_{FISH} et bactéries apparentées"). (Campagne de Juin 2009, toutes stations confondues ; n=5). Le τ est le coefficient de corrélation de Kendall, il est en rouge lorsqu'il est significatif ($p \leq 0.05$).

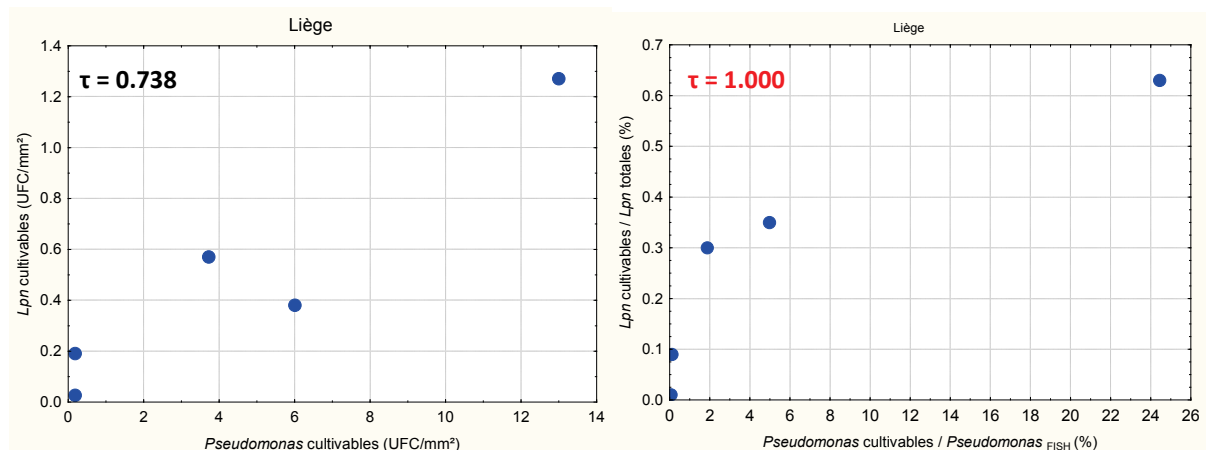


Figure 113 : Evolution des concentrations et des proportions de *Lpn*_{cultivables} ($Lpn_{\text{cultivables}}/Lpn_{\text{totales}}$) en fonction de la concentration et des proportions des bactéries du groupe "*Pseudomonas*_{cultivables} et bactéries apparentées" ("*Pseudomonas*_{cultivables} et bactéries apparentées"/"*Pseudomonas*_{FISH} et bactéries apparentées"). (Station Liège, toutes campagnes confondues ; n=5). Le τ est le coefficient de corrélation de Kendall, il est en rouge lorsqu'il est significatif ($p \leq 0.05$).

A l'inverse, lorsqu'on compare les campagnes de mesure en considérant la totalité des bactéries de chacune des deux groupes (Lpn_{totales} et "*Pseudomonas*_{FISH} et bactéries apparentées"), on observe effectivement une relation inverse, dans le cas de trois des six campagnes (décembre 2007, juin 2008 et décembre 2008). Pour les autres campagnes la corrélation entre les deux groupes reste indéterminée (Figure 114).

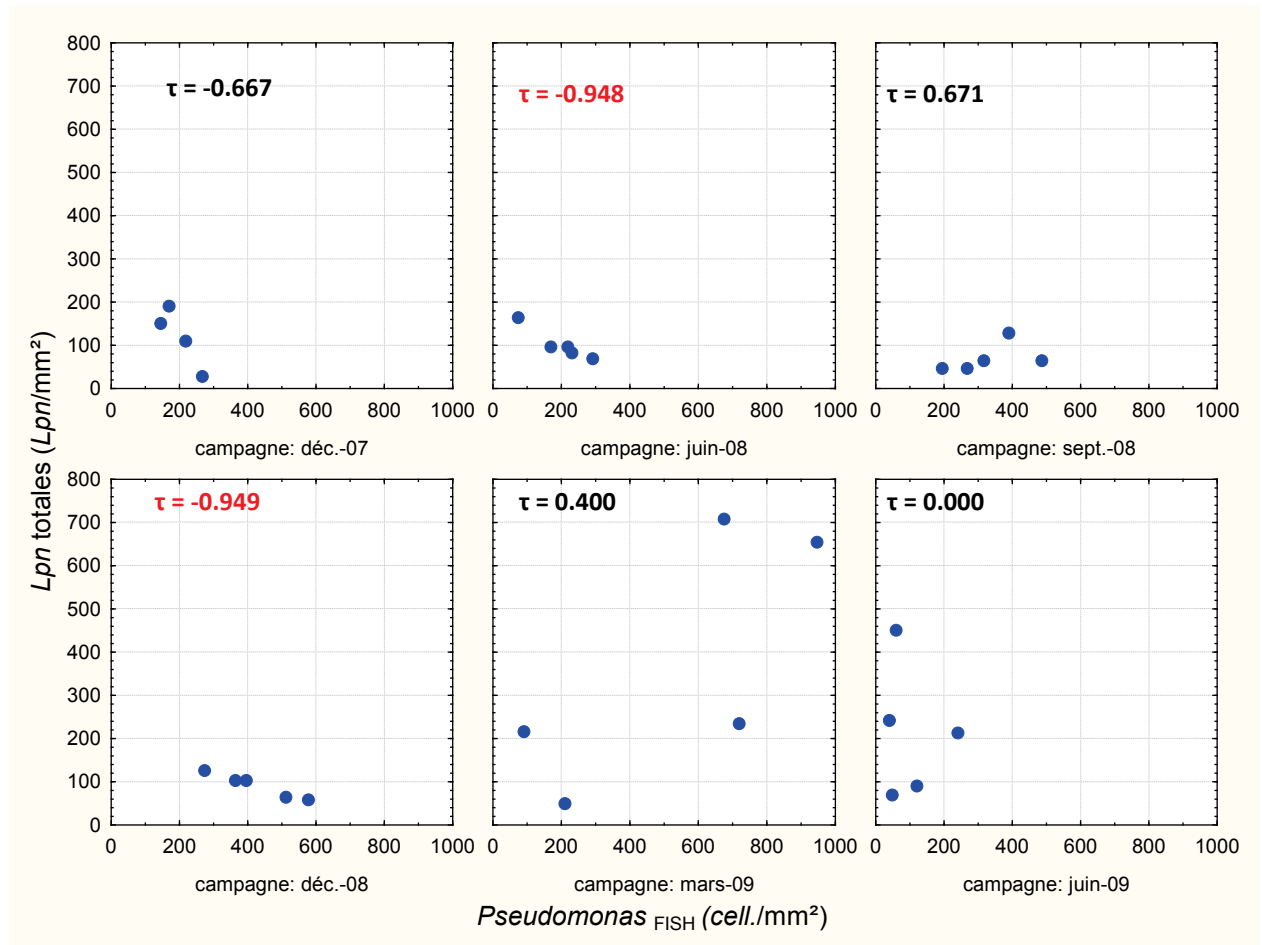


Figure 114 : Concentrations en Lpn_{totales} en fonction des concentrations en " $Pseudomonas_{\text{FISH}}$ et bactéries apparentées" selon la campagne. (n=4 à 5). Le τ est le coefficient de corrélation de Kendall, il est en rouge lorsqu'il est significatif ($p \leq 0.05$).

Lorsque l'on sépare les données non pas par campagne, mais par station, seules les stations Liège et Lepic présentent un antagonisme (Figure 115) mais uniquement en dessous d'une concentration seuil pour la station Lepic. Ce seuil se situe à une concentration des bactéries du groupe " $Pseudomonas_{\text{FISH}}$ et bactéries apparentées" comprise entre 500 et 600 cell./mm².

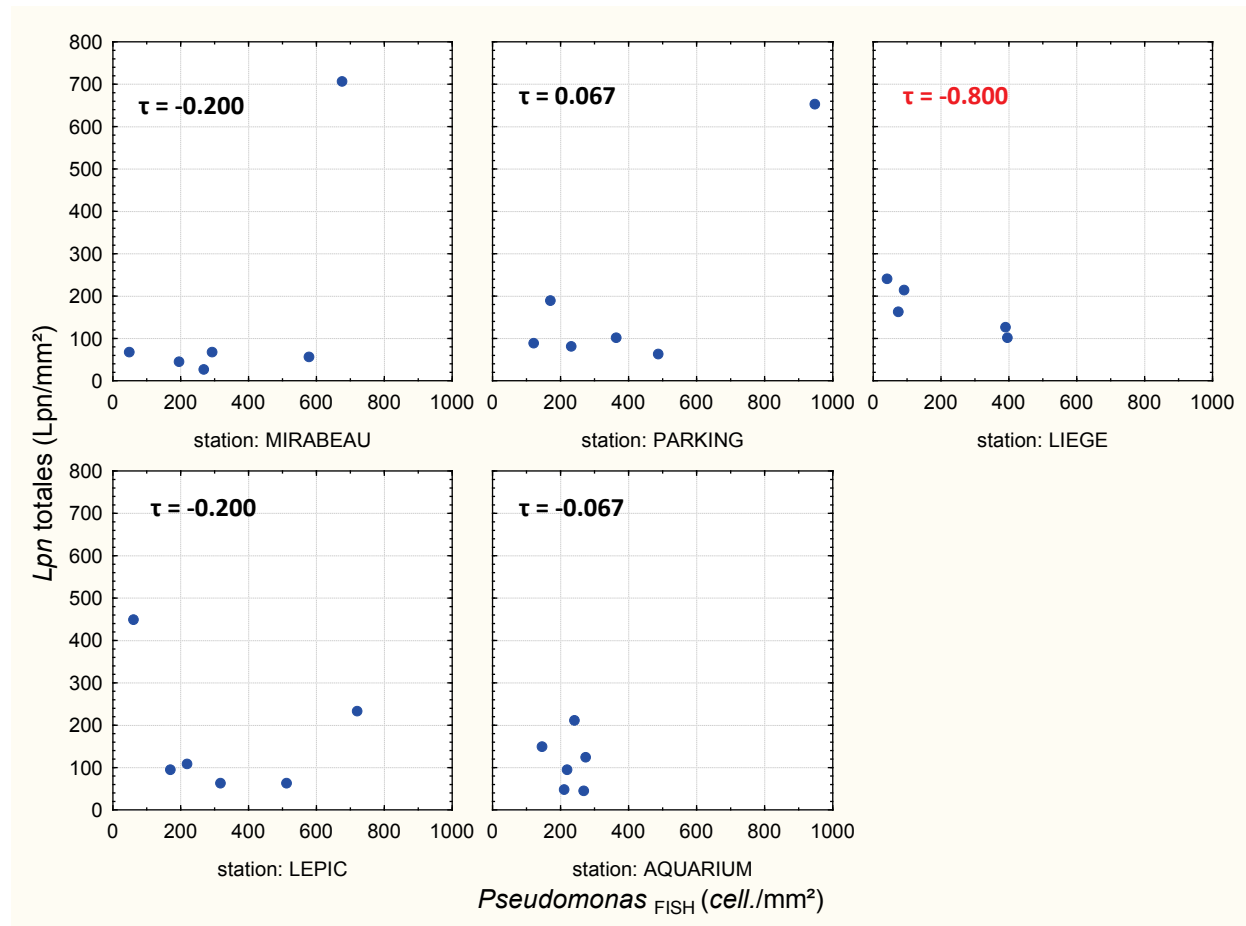


Figure 115 : Concentrations en Lpn_{totales} en fonction des concentrations en " $Pseudomonas_{\text{FISH}}$ et bactéries apparentées" selon la station (n=5 à 6). Le τ est le coefficient de corrélation de Kendall, il est en rouge lorsqu'il est significatif ($p \leq 0.05$).

L'existence de cet antagonisme n'apparaît généralement plus lorsque l'on considère les proportions des bactéries des deux groupes au sein de la communauté bactérienne totale.

Nos résultats suggèrent l'existence effective d'un antagonisme entre Lpn et les bactéries du groupe " $Pseudomonas_{\text{FISH}}$ et bactéries apparentées" dans les biofilms du réseau étudié, mais seulement dans les contextes particuliers de certaines campagnes ou de certaines stations. Il ne concerne de toute façon que les « effectifs totaux » des deux groupes.

Dans le cas des formes cultivables, c'est au contraire, une relation positive qui apparaît, elle aussi, dans certains contextes d'espace ou de temps.

Le cas particulier de la station Liège est à souligner par le fait que les deux types de relation y sont réunis.

6.2 Recherche des principaux facteurs de régulation de Lpn dans les biofilms du réseau aixois

Cette étude vient en complément de la recherche des effets des apports d'eaux thermales sur les biofilms. Son objectif est d'identifier les facteurs du milieu qui influencent le développement du biofilm, mais aussi le maintien de Lpn , voire sa multiplication.

6.2.1 Analyse de la structure générale des données et mise en évidence de termes de regroupements explicites.

Cette analyse a pour but de déterminer la structure générale des données acquises sur le réseau aixois, notamment en liaison avec les points d'arrivée des eaux thermales et une éventuelle partition du temps en une période froide et une période chaude.

Pour cela, une 1^{ère} analyse en composante principale est effectuée en considérant les principaux descripteurs physico-chimiques et biologiques (Tableau 78). Les résultats sont présentés dans la Figure 116.

Tableau 78 : Liste des descripteurs utilisés dans l'ACP.

Descripteurs physico-chimiques du cours d'eau	Descripteurs biologiques
pH Conductivité COD Température médiane Débit médian	Bactéries _{totales} Bactéries _{cultivables} <i>Lpn</i> _{totales} <i>Lpn</i> _{cultivables} Groupe " <i>Pseudomonas</i> _{FISH} et bactéries apparentées" Groupe " <i>Pseudomonas</i> _{cultivables} et bactéries apparentées" Flagellés Amibes Ciliés Poids sec du biofilm Matière organique du biofilm

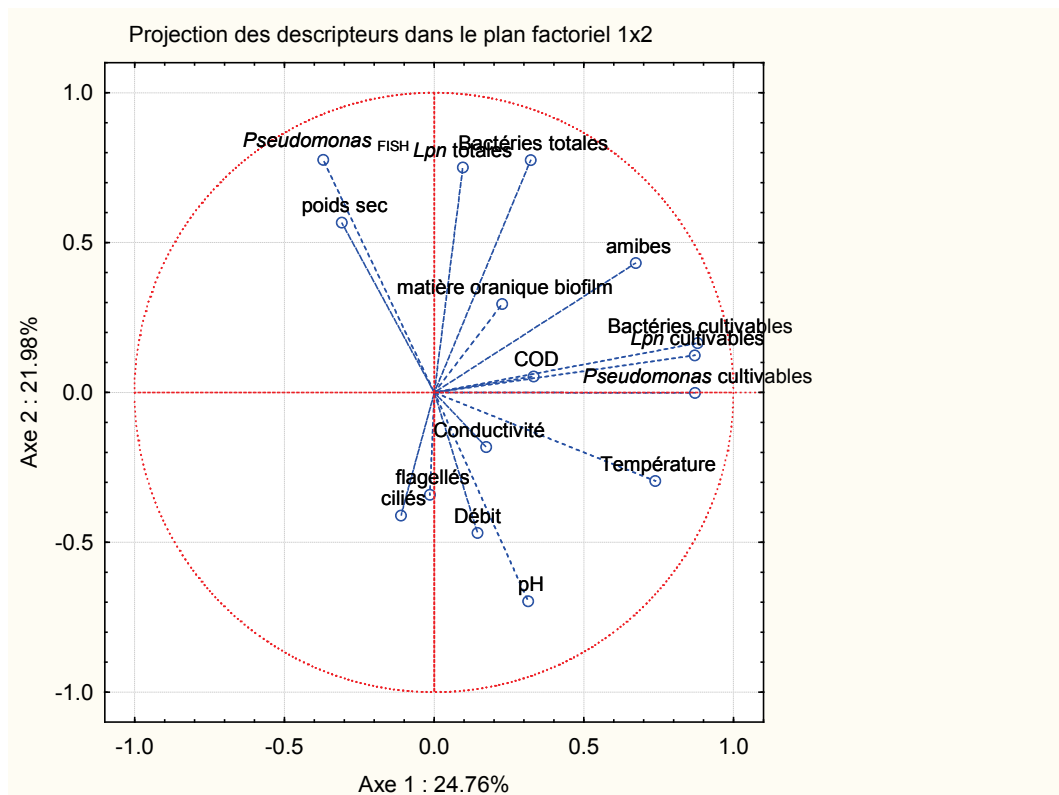


Figure 116 : Cercle factoriel des descripteurs dans le plan formé par les deux premiers axes

Les descripteurs caractéristiques des deux premiers axes sont présentés dans le Tableau 79. Ces deux axes n'expliquent que 48.41% de la variance.

Tableau 79 : Descripteurs caractéristiques des 2 premiers axes de l'ACP.

AXE 1		AXE 2	
Bactéries cultivables	0.88	Groupe " <i>Pseudomonas</i> _{FISH} et bactéries apparentées"	0.78
Groupe " <i>Pseudomonas</i> _{cultivables} et bactéries apparentées"	0.87	Bactéries totales	0.78
<i>Lpn</i> cultivables	0.87	<i>Lpn</i> _{totales}	0.75
Température	0.74	Poids sec biofilm	0.57
Amibes	0.67	Amibes	0.43
Groupe " <i>Pseudomonas</i> _{FISH} et bactéries apparentées"	-0.37	pH	-0.70
		Débit médian	-0.47
		Ciliés	-0.41

Le premier axe correspond principalement au développement de la fraction cultivable du biofilm. Le deuxième axe oppose les descripteurs du cours d'eau (pH, débit) ainsi que les concentrations en ciliés, aux descripteurs du développement général du biofilm (poids sec, concentration des bactéries totales, de *Lpn*_{totales} et des bactéries du groupe "*Pseudomonas*_{FISH} et bactéries apparentées").

Le plan des deux premiers axes fait apparaître une indépendance entre la température médiane durant l'incubation et le développement du biofilm (bactéries totales, flagellés et ciliés). Les concentrations en amibes sont indépendantes à la fois de la conductivité de l'eau, du poids sec du biofilm mais aussi des concentrations de "*Pseudomonas*_{FISH} et des bactéries apparentées". Le débit n'a pas d'influence sur les formes cultivables (des bactéries et plus spécifiquement de *Lpn*). Les concentrations de flagellés ne dépendent pas de celles des bactéries du groupe "*Pseudomonas*_{cultivables} et bactéries apparentées". Par contre, les concentrations des ciliés sont opposées à celles des bactéries_{totales} du biofilm, mettant ainsi en évidence la possibilité d'une prédation des bactéries par ces protistes.

La projection des stations, dans le plan factoriel 1x2 (Figure 117), montre une opposition, sur le premier axe, du groupe formé par les stations Mirabeau et Parking au groupe des stations Aquarium et Lepic lors des campagnes de septembre 2008 et juin 2009. Le deuxième axe oppose quant à lui le groupe des campagnes de décembre 2007 et juin 2008 à celle de mars 2009 notamment pour la station Lepic. Les stations Mirabeau et Parking sont très proches au cours de deux des campagnes hivernales : décembre 2008 et mars 2009.

Les trajectoires des stations Mirabeau, Parking et Lepic, en période froide (décembre 07, décembre 08 et mars 09) s'établissent le long de l'axe 2 et suggèrent des variations interannuelles de la composition microbienne des biofilms. Compte tenu de la nature des descripteurs les mieux représentés sur cet axe, l'évolution concernerait plus particulièrement les concentrations de "*Pseudomonas*_{FISH} et des bactéries apparentées", des bactéries_{totales} et de *Lpn*_{totales}. En période chaude, seules les projections de la station Lepic sont significatives et suggèrent une évolution interannuelle le long de l'axe 1 gouverné principalement par les formes cultivables tout à la fois, des bactéries_{totales}, des bactéries du groupe "*Pseudomonas* et bactéries apparentées" et de *Lpn*.

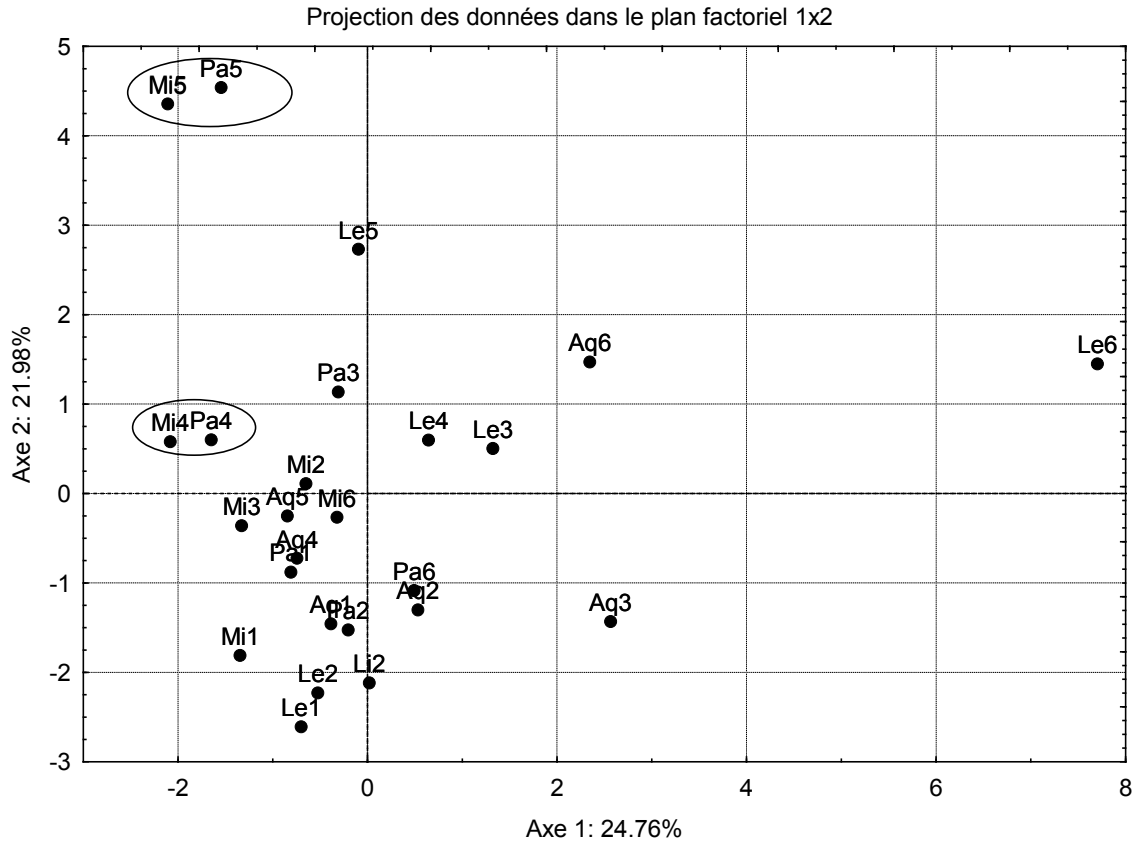


Figure 117 : Projection des prélèvements dans le plan factoriel constitué des 2 premiers axes
 Codes des stations : Mi: Mirabeau, Pa: Parking, Li: Liège, Le: Lepic, Aq: Aquarium;
 Codes des périodes : 1: décembre 07, 2: juin 08, 3: septembre 08, 4: décembre 08, 5: mars 09, 6: juin 09.

Le troisième axe de l'ACP oppose le groupe conductivité de l'eau, concentrations des ciliés et de Lpn_{totales} au groupe concentration en COD de l'eau et poids de matière organique du biofilm (Figure 118 et Tableau 80).

Le plan factoriel 1x3, fait apparaître une indépendance entre les concentrations en ciliés et la fraction bactérienne cultivable du biofilm (bactéries totales, Lpn et bactéries du groupe "*Pseudomonas* et bactéries apparentées") mais également entre le groupe Lpn_{totales} - conductivité et celui de la concentration en amibes et en bactéries du groupe "*Pseudomonas*_{FISH} et bactéries apparentées". On remarque en outre une opposition entre la concentration des bactéries de ce groupe et l'ensemble formé par le pH et la température de l'eau.

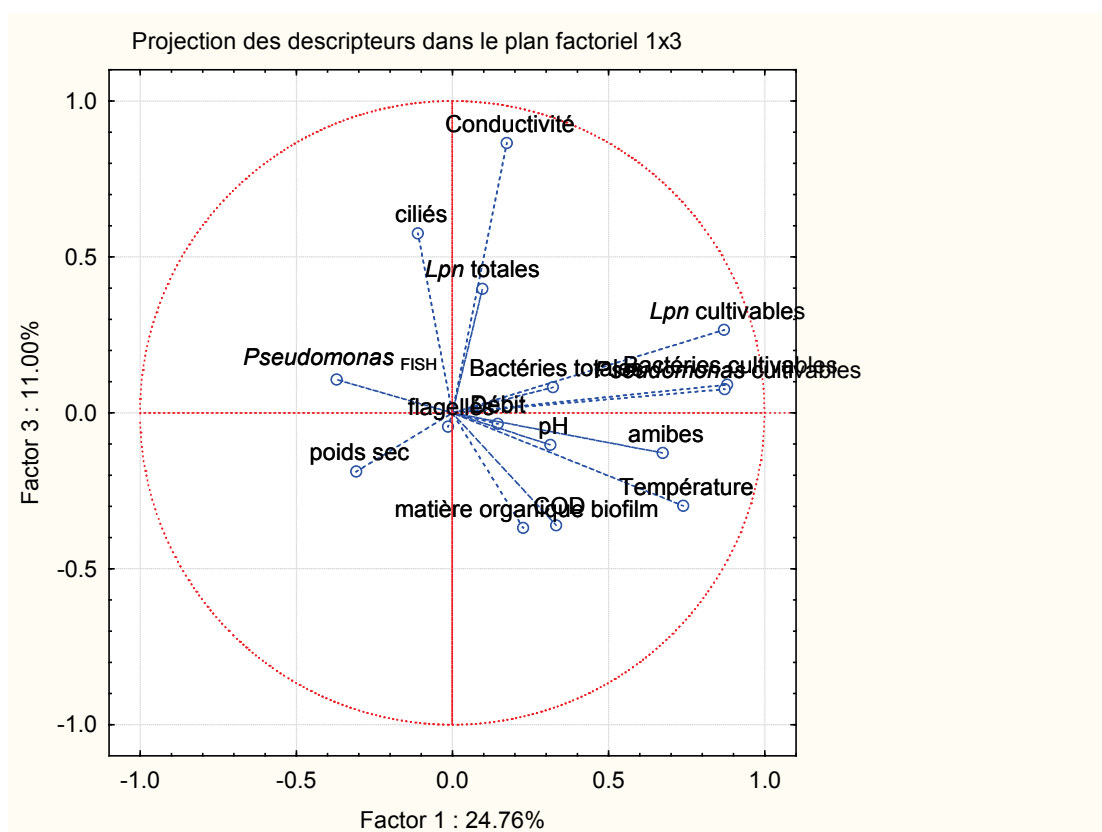


Figure 118 : Cercle factoriel des descripteurs dans le plan formé par les axes 1 et 3.

Tableau 80 : Descripteurs caractéristiques du troisième axe de l'ACP.

Axe 3	
Conductivité	0.86
Ciliés	0.57
Lpn totales	0.40
Matière organique biofilm	-0.37
COD	-0.36

Bien qu'il implique l'axe 3, le plan factoriel 1x3 apporte des informations complémentaires sur la structure des données (Figure 119). Comme précédemment, le premier axe est basé principalement sur le caractère cultivable du biofilm. Ces deux axes mettent mieux en évidence l'isolement de la station Mirabeau par rapport au reste du réseau. Quant à l'axe 3, basé sur les caractéristiques chimiques générales de l'eau, il a tendance à opposer les campagnes estivales (juin 2008, septembre 2008 et juin 2009) aux campagnes hivernales (décembre 2007, décembre 2008 et mars 2009).

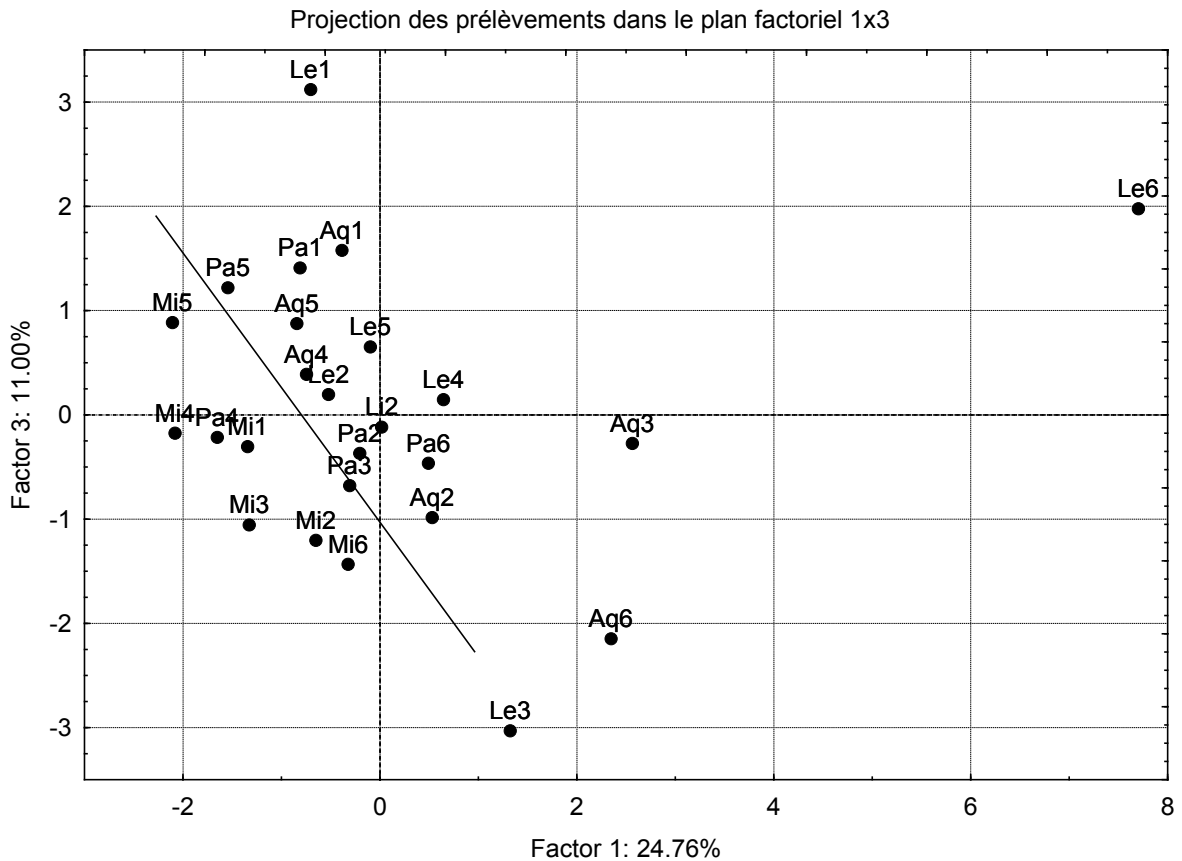


Figure 119 : Projection des prélèvements dans le plan factoriel constitué des axes 1 et 3
 Codes des stations : Mi:Mirabeau, Pa: Parking, Li: Liège, Le:Lepic, Aq: Aquarium;
 Codes des périodes : 1: décembre 07, 2: juin 08, 3: septembre 08, 4: décembre 08, 5: mars 09, 6: juin 09.

La prise en compte de l'ensemble des descripteurs ne permet donc pas d'identifier de façon assez fine la structure du réseau, ni son évolution au cours du temps. Seules en ressortent les spécificités de la station Mirabeau ainsi qu'un comportement variable des autres stations selon la saison. De plus, on ne retrouve pas l'antagonisme observé précédemment entre les concentrations de *Lpn* et celles des bactéries du groupe "*Pseudomonas* et bactéries apparentées". Nous avons alors voulu affiner l'analyse des données en cherchant les regroupements possibles qui pouvaient être faits entre certaines stations.

Par ailleurs, l'importance des facteurs physico-chimiques en tant que "*driving forces*" sur la structure des biofilms présents dans le bassin versant du lac, nous a incité à effectuer une ACP en excluant tous les descripteurs biologiques du biofilm (Tableau 81).

Tableau 81 : Liste des descripteurs utilisés au cours de la seconde ACP.

Descripteurs physico-chimiques du cours d'eau
Chlorures
Sulfates
Nitrates
Phosphates
Potassium
Calcium
Magnésium
pH
COD
Température médiane
Débit médian

Le premier axe de cette nouvelle analyse représente principalement les concentrations ioniques, la conductivité et la température, alors que le deuxième axe correspond plutôt aux descripteurs physico-chimiques « globaux » (COD, température, débit, pH). Ces deux premiers axes expliquent 46.84% de la variance totale des échantillons (Figure 120 et Tableau 82).

Tableau 82

Le plan factoriel 1x2 montre l'indépendance entre la concentration en phosphates et le groupe conductivité, concentration en chlorures. Il en est de même entre le débit et le groupe des concentrations en sodium, magnésium et sulfates. Les ions sulfates étant le marqueur de l'arrivée des eaux thermales, l'absence de corrélation avec le débit montre que ce dernier n'est pas spécialement expliqué par les arrivées des eaux thermales. On remarque également que les concentrations en nitrates ne dépendent ni de la température, ni du pH.

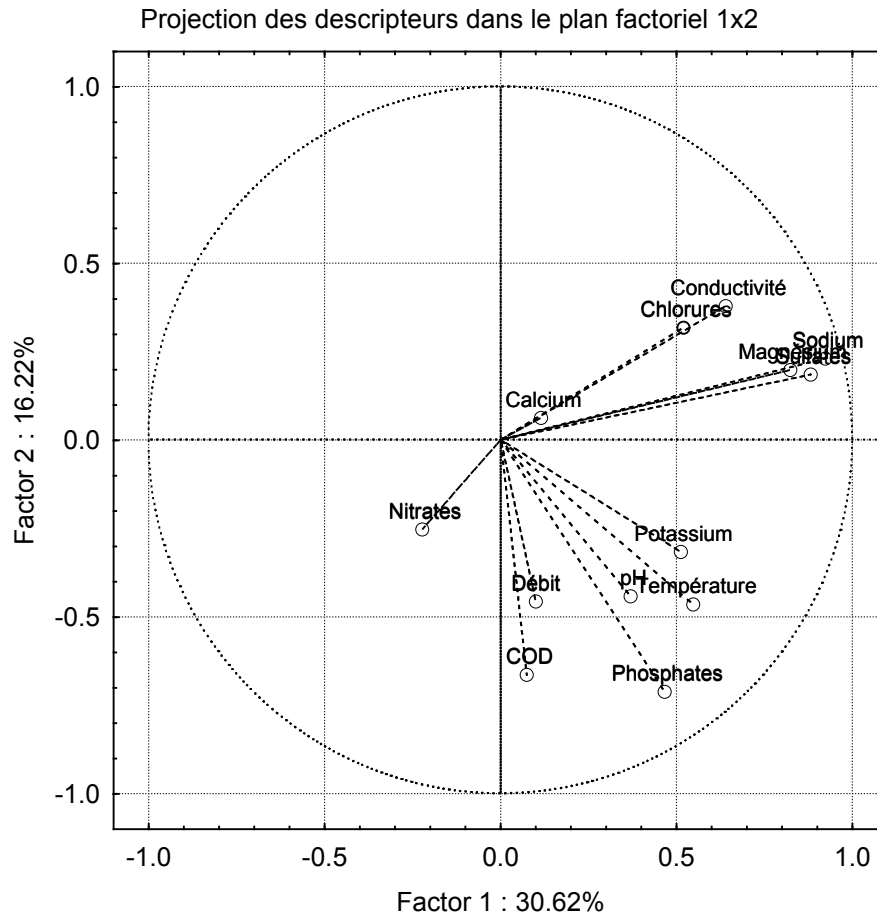


Figure 120 : Cercle factoriel des descripteurs dans le plan formé par les axes 1 et 2.

Tableau 82 : Descripteurs caractéristiques des 2 premiers axes de l'ACP.

Axe 1		Axe 2	
Sodium	0.92		
Sulfates	0.88		
Magnésium	0.82		
Conductivité	0.64		
Température	0.54		
Chlorures	0.52		
Potassium	0.51		
Phosphates	0.47		
		Phosphates	-0.71
		COD	-0.66
		Température	-0.46
		Débit	-0.46
		pH	-0.44

La projection des échantillons dans le plan factoriel défini par les deux premiers axes permet de définir plusieurs groupes d'échantillons (Figure 121). En effet, le premier axe oppose la station Mirabeau aux autres stations. La station Mirabeau se caractérisant plutôt par des eaux pauvres en ions. Le deuxième axe permet d'isoler la station Parking.

La station Aquarium se distingue par un contraste particulièrement marqué de son environnement physico-chimique entre une période froide et une période chaude. La période froide correspond au regroupement, pour cette station, de la campagne de mars 2009 avec celles de décembre 2007 et 2008, et la période chaude au regroupement de la campagne de septembre 2008 avec celles des mois de juin 2008 et 2009 (ces dernières étant caractérisées par des valeurs élevées des descripteurs physico-chimiques).

A la station Lepic, les campagnes de juin 2008 et 2009 montrent une opposition beaucoup moins marquée avec les campagnes hivernales. Cette station reste mal représentée sur l'axe 2, tout comme le sont les campagnes hivernales à la station Aquarium.

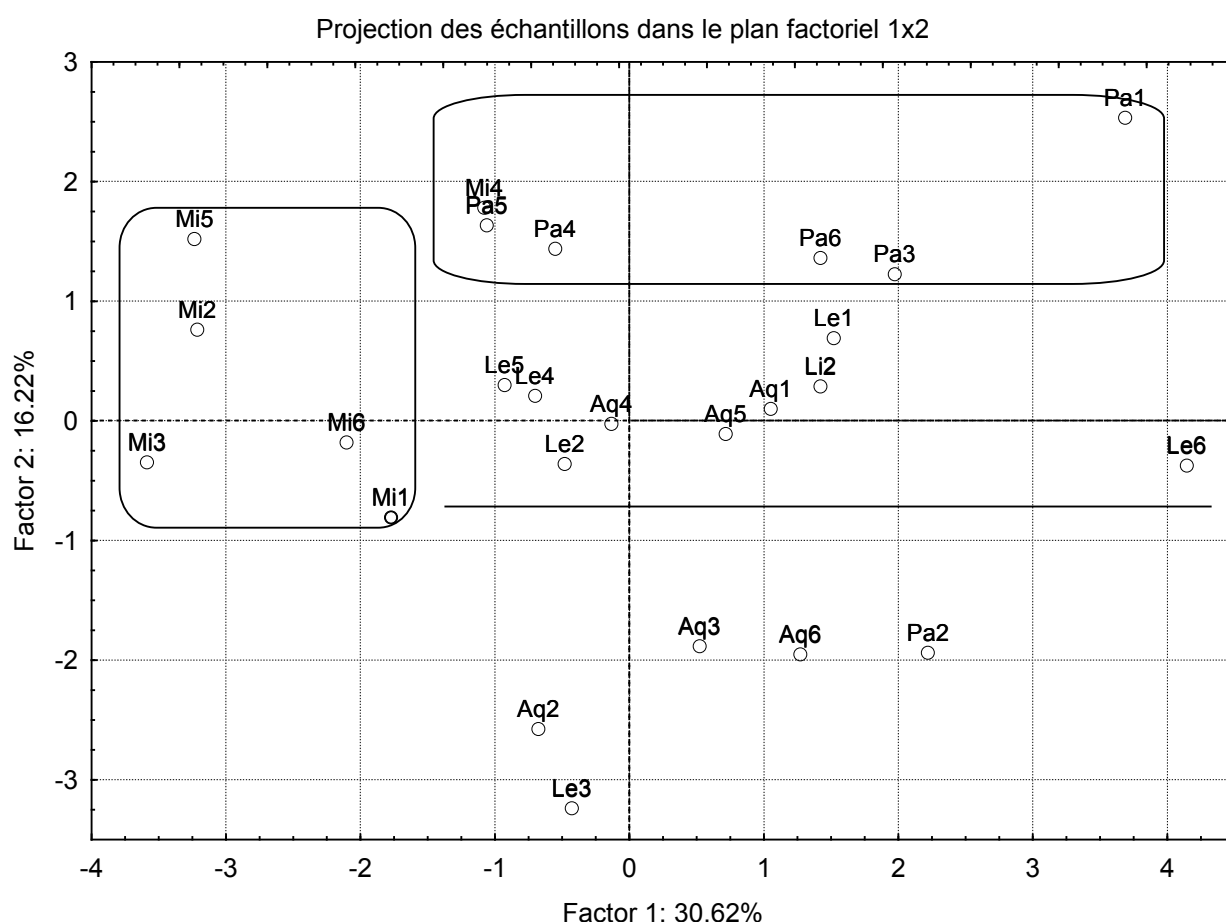


Figure 121 : Projection des prélèvements dans le plan factoriel constitué des 2 premiers axes
 Codes des stations Mi: Mirabeau, Pa: Parking, Li: Liège, Le: Lepic, Aq: Aquarium;
 Codes des périodes 1: décembre 07, 2: juin 08, 3: septembre 08, 4: décembre 08, 5: mars 09, 6: juin 09.

L'utilisation du troisième axe est nécessaire pour la mise en évidence de la séparation des deux périodes (froide et chaude) à la station Lepic (Figure 123). Cet axe est caractérisé par la conductivité, les concentrations en nitrates, chlorures et calcium ainsi que par la température (Figure 122 et Tableau 83). La concentration en nitrates est opposée à celle des ions calcium et ces espèces ioniques sont indépendantes des ions potassium.

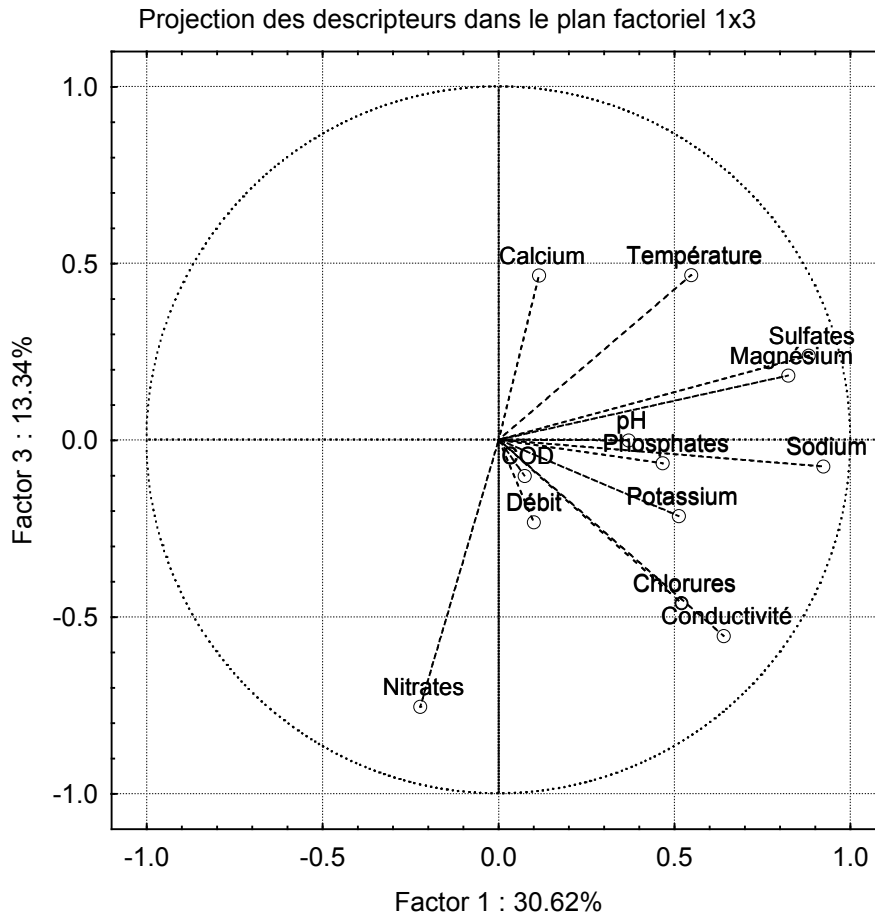


Figure 122 : Cercle factoriel des descripteurs dans le plan formé par les axes 1 et 3.

Tableau 83 : Descripteurs caractéristiques du 3^{ème} axe de l'ACP.

Axe 3	
Nitrates	-0.75
Conductivité	-0.55
Chlorures	-0.46
Calcium	0.46
Température	0.46

La station Lepic est mieux représentée sur l'axe 3 qu'elle ne l'était sur l'axe 2 (Figure 123). C'est également le cas des campagnes hivernales de la station Aquarium. Ce troisième axe permet donc de regrouper les stations Lepic et Aquarium tout en distinguant au sein même de ce groupe les campagnes hivernales (décembre 2007, 2008 et mars 2009) des campagnes estivales (juin 2008, 2009 et septembre 2008). Sur ce plan factoriel et dans le cas des campagnes estivales, ces deux stations se rapprochent de la station Parking.

Le quasi étiage de la branche souterraine du Tillet et donc la réduction des apports de ce cours d'eau à la Chaudanne, redonne aux parties situées en aval (stations Lepic et Aquarium) des caractéristiques propres à ce cours d'eau qui peuvent expliquer le rapprochement.

L'observation du rapprochement des caractéristiques physiques et chimiques des stations aval de celles des stations amont durant la période estivale, laisse supposer une influence des rejets thermaux plus marquée à cette période, notamment du point de vue des apports en légionelles. En conséquence, il pourrait se produire une coexistence durant la période froide de populations d'origines différentes, apports thermaux d'une part, apports du bassin versant du Tillet d'autre part.

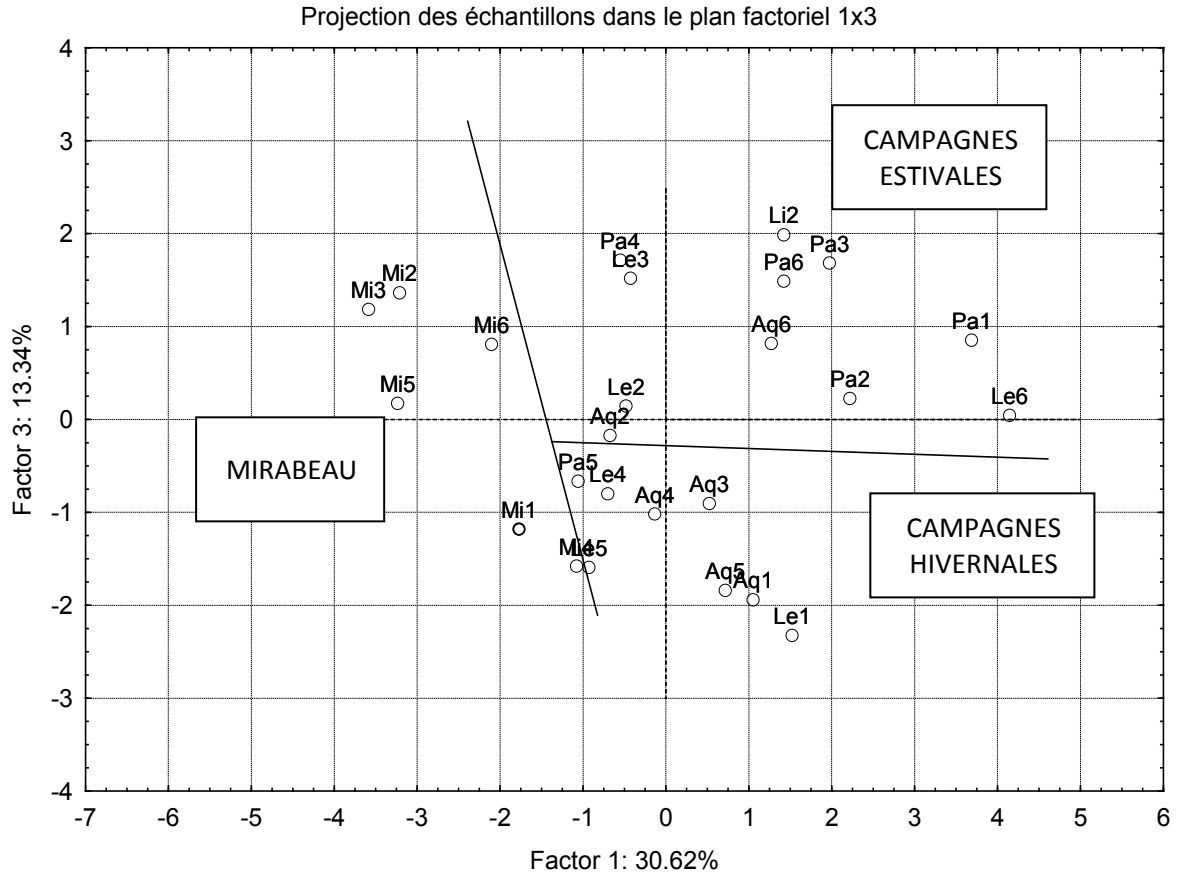


Figure 123: Projection des prélèvements dans le plan factoriel constitué des 2 premiers axes
 Codes des stations : Mi: Mirabeau, Pa: Parking, Li: Liège, Le: Lepic, Aq : Aquarium;
 Codes des campagnes : 1: décembre 07, 2: juin 08, 3: septembre 08, 4: décembre 08, 5: mars 09, 6: juin 09)

Le cas de la station Liège est particulier en raison, rappelons-le, de la panne du limnigraphe qui a pour conséquence l'absence de données de température et de débit pour les campagnes postérieures à juin 2008. Ainsi, seule la campagne de juin 2008 est complète et donc intégrée aux analyses précédentes.

D'une manière générale cette campagne apparaît groupée avec les campagnes estivales des stations Lepic et Aquarium. De fait, en raison de sa localisation, à l'aval des deux arrivées thermales, nous avons fait le choix de l'intégrer au groupe des stations Lepic et Aquarium.

En résumé, l'ensemble de ces analyses nous permettent de constituer les quatre groupes d'échantillons suivants :

- Mirabeau
- Parking
- Liège - Lepic – Aquarium lors des campagnes hivernales (déc. 07/09 et mars 09)
- Liège - Lepic – Aquarium lors des campagnes estivales (juin 08/09 et sept. 08)

6.2.2 Recherche des principaux facteurs de régulation de *Lpn* sur la base des groupes d'échantillons précédemment constitués

A l'intérieur de chacun de ces groupes, nous recherchons ici les facteurs environnementaux susceptibles de favoriser la présence de *Lpn* dans les biofilms. Des corrélations entre les descripteurs biologiques seront également recherchées afin d'identifier les groupes d'organismes qui pourraient influencer le développement de *Lpn* dans les biofilms.

Le nombre restreint d'observations au sein de chaque groupe d'échantillons ne permet pas d'effectuer de nouvelles ACP spécifiques à ces groupes. Dans l'alternative, leur analyse a été réalisée par une méthode statistique non paramétrique : le calcul de corrélation de rang (τ de Kendall ; $\alpha=5\%$) entre chacun des descripteurs de *Lpn* et chacun des autres descripteurs pris deux à deux (Tableau 84). Les calculs des corrélations sont effectués, soit en faisant intervenir les descripteurs biologiques simples soit en faisant intervenir les rapports entre descripteurs biologiques.

Tableau 84 : Liste des descripteurs impliqués dans les calculs du coefficient de corrélation τ de Kendall.

Descripteurs physico-chimiques du cours d'eau	Descripteurs biologiques simples	Descripteurs biologiques complexes
Code vitesse	Bactéries _{totales}	Bactéries _{cultivables} / Bactéries _{totales}
Chlorures	Bactéries _{cultivables}	<i>Lpn</i> _{totales} / Bactéries _{totales}
Sulfates	<i>Lpn</i> _{totales}	" <i>Pseudomonas</i> _{FISH} et bactéries apparentées" / Bactéries _{totales}
Nitrates	<i>Lpn</i> _{cultivables}	<i>Lpn</i> _{FISH} / " <i>Pseudomonas</i> _{FISH} et bactéries apparentées"
Phosphates	Groupe " <i>Pseudomonas</i> _{FISH} et bactéries apparentées"	<i>Lpn</i> _{cultivables} / Bactéries _{cultivables}
Potassium	Groupe " <i>Pseudomonas</i> _{cultivables} et bactéries apparentées"	<i>Lpn</i> _{cultivables} / <i>Lpn</i> _{totales}
Calcium	Flagellés (pigmentés, non pigmentés)	<i>Lpn</i> _{cultivables} / amibes
Magnésium	Amibes	" <i>Pseudomonas</i> _{cultivables} et bactéries apparentées" / Bactéries _{cultivables}
pH	Ciliés	" <i>Pseudomonas</i> _{cultivables} et bactéries apparentées" / " <i>Pseudomonas</i> _{FISH} et bactéries apparentées"
Conductivité	Protistes	Bactéries _{totales} / amibes
COD	Poids sec du biofilm	Flagellés pigmentés / Flagellés totaux
Température médiane	Matière organique du biofilm	Flagellés / Bactéries _{totales}
Degré jour		Flagellés / Bactéries _{cultivables}
Débit médian (pré-incubation, incubation ou l'ensemble des 2 périodes)		Matière organique biofilm / Poids sec
Nombre de variations de débit (>50% ; >100% ; 50%<<100% à chacune de ces 3 périodes)		

6.2.2.1 Station Mirabeau

La station Mirabeau constitue à elle seule le premier groupe de données. Au niveau de cette station, les débits ne semblent pas impliqués dans les variations de développement des biofilms. L'augmentation de la fréquence des périodes d'accroissement significatif du débit a tendance à augmenter le poids sec des biofilms échantillonnés, probablement parce que les biofilms se sont développés, pendant ces périodes, dans une eau dont la charge particulaire moyenne était plus importante. Ce phénomène était favorisé par le positionnement des lames à proximité du sédiment fin qui recouvre le fond de la cuvette.

Par ailleurs, lorsque ces fortes augmentations de débit sont plus fréquentes, les bactéries du groupe "*Pseudomonas* et bactéries apparentées" sont moins cultivables. L'effet de variations rapides du débit sur ce groupe est donc différent de celui d'une modification du débit médian. Les variations intermédiaires du débit (entre 50 et 100% du débit de la veille) semblent engendrer une augmentation des concentrations en nitrates et ont tendance à défavoriser les amibes et plus généralement les protistes des biofilms.

Le second facteur qui nous intéresse plus particulièrement est la température (Figure 124). Le fait de considérer la température médiane lors de l'incubation des lames ou la valeur en degré jour n'engendre pas de différence dans les résultats obtenus. Les périodes plus chaudes conduisent à des concentrations plus faibles de bactéries du groupe "*Pseudomonas*_{FISH} et bactéries apparentées" et à des biofilms contenant moins de matière organique que lors des campagnes plus froides. Par contre, la température n'influence pas la concentration de *Lpn*.

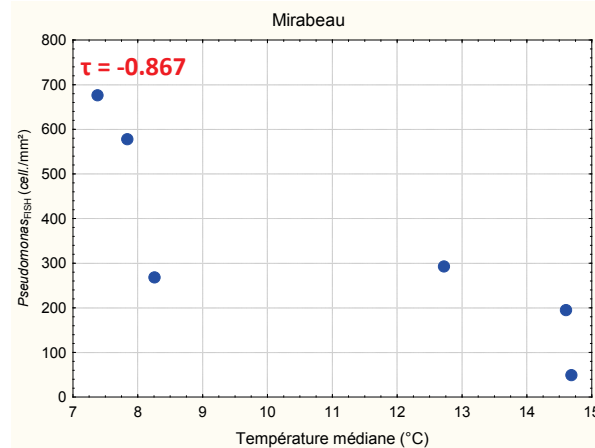


Figure 124 : Influence de la température sur les concentrations de "*Pseudomonas*_{FISH} et bactéries apparentées" à la station Mirabeau (n=6). Le τ est le coefficient de corrélation de Kendall, il est en rouge lorsqu'il est significatif ($p \leq 0.05$).

La Figure 125 montre qu'un pH acide paraît plus favorable à *Lpn*_{totales} qu'aux autres organismes des biofilms (bactéries totales ou amibes, même si l'on ne prend pas en considération l'observation du mois de mars 2009 où le pH est de 8.00). Dans le cas du rapport *Lpn* totales/amibes, ce résultat peut être dû à l'augmentation des légionelles issues du développement intra amibien et à l'éclatement simultané des amibes.

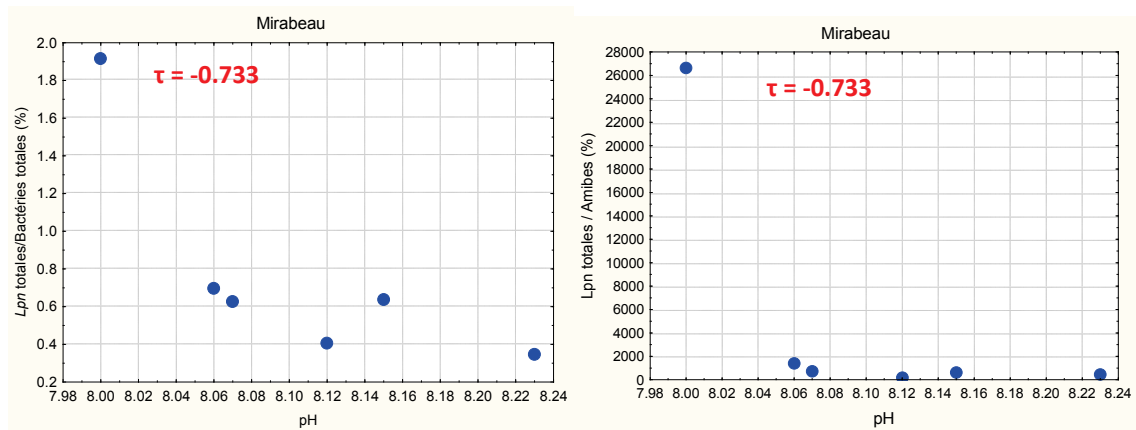


Figure 125 : Effet du pH sur les rapports $Lpn_{\text{totales}}/Bactéries_{\text{totales}}$ (DAPI) et $Lpn_{\text{totales}}/Amibes$ à la station Mirabeau (n=6). Le τ est le coefficient de corrélation de Kendall, il est en rouge lorsqu'il est significatif ($p \leq 0.05$).

Il est surprenant de constater que les biofilms les plus organiques se sont développés dans les périodes durant lesquelles la concentration en COD de l'eau était la plus faible. Les bactéries du groupe "*Pseudomonas*_{FISH} et bactéries apparentées" apparaissent également défavorisées par les fortes concentrations en COD de l'eau. Enfin, les augmentations en COD de l'eau correspondent à des périodes d'enrichissement en ion potassium dans l'eau (Figure 126).

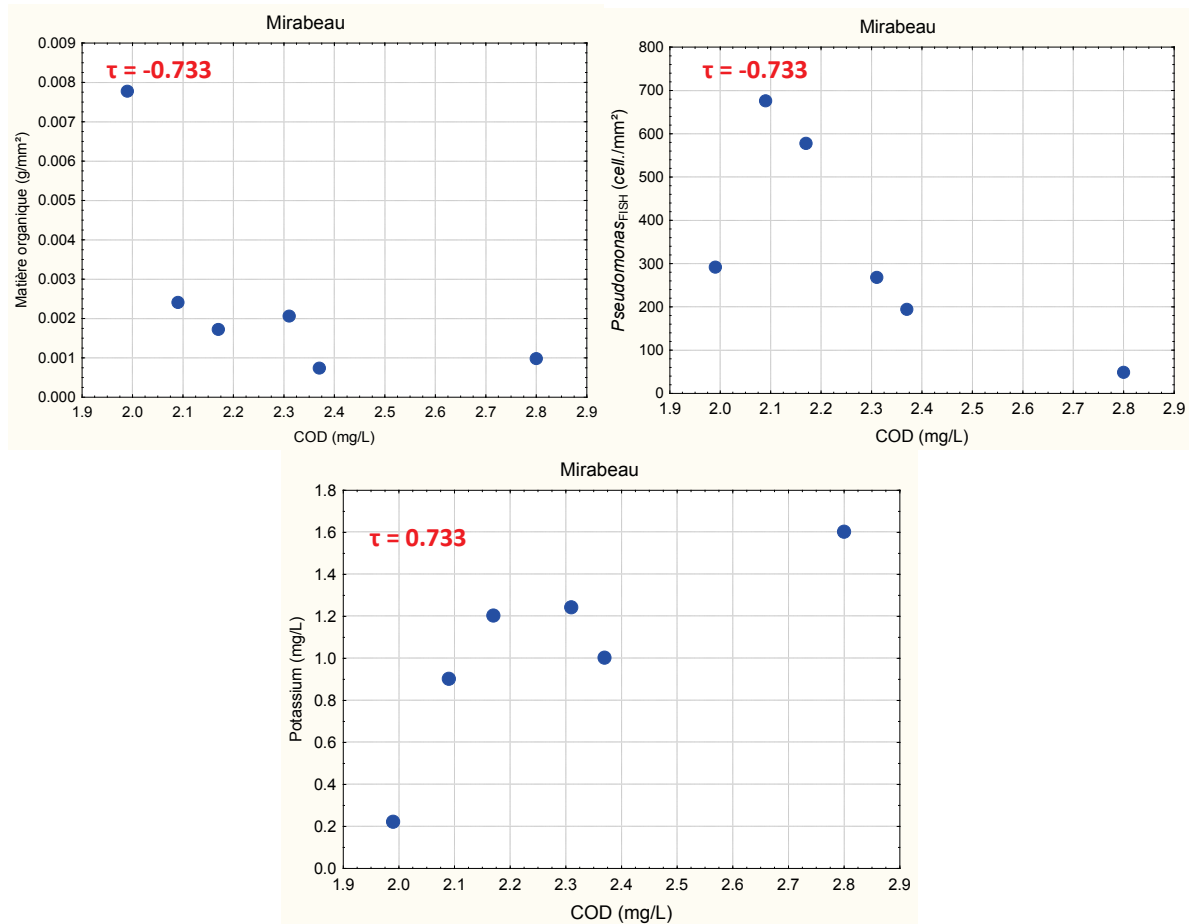


Figure 126 : Effet de la concentration en COD de l'eau sur le développement de la fraction organique du biofilm, sur les concentrations des bactéries du groupe "*Pseudomonas_FISH* et bactéries apparentées", ainsi que sur la concentration en potassium de l'eau (n=6). Le τ est le coefficient de corrélation de Kendall, il est en rouge lorsqu'il est significatif ($p \leq 0.05$).

Chaque espèce ionique est corrélée à un descripteur biologique différent. D'une manière générale, la valeur de la conductivité n'est pas corrélée au développement du biofilm.

A l'exception d'une campagne qui se détache des autres, les eaux alcalines ou les eaux à forte concentration en ions potassium sont associées à des biofilms pour lesquels le rapport $Lpn_{\text{totales}} / \text{amibes}$ est faible (Figure 127). Comme montré précédemment, l'ion K^+ est également corrélé positivement à la concentration en COD. Par ailleurs, ses valeurs les plus fortes sont observées en hiver. En supposant qu'il ne trouve pas son origine dans l'érosion du substrat, il est possible qu'il provienne du salage des routes. Cette observation est cependant mise en doute par la campagne de juin 2009 au cours de laquelle sa concentration est maximale. Un apport par des engrais n'est alors pas à exclure.

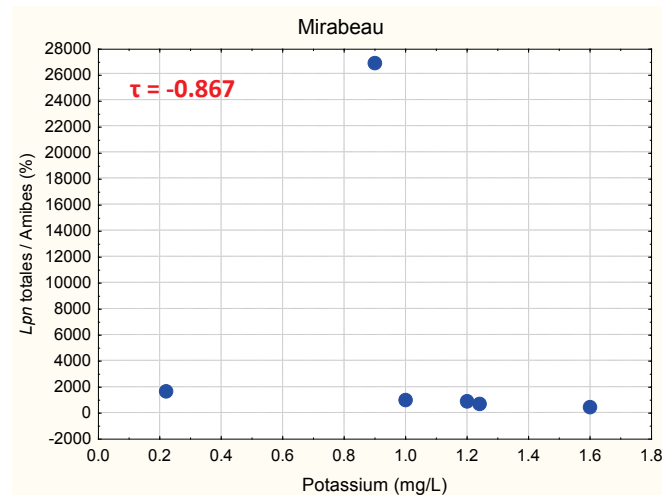


Figure 127 : Influence des ions potassium sur le rapport L_{pn} totales / amibes ($n=6$). Le τ est le coefficient de corrélation de Kendall, il est en rouge lorsqu'il est significatif ($p \leq 0.05$).

L'étroite corrélation entre les ions chlorures et sodium ($\tau = 0.83$) indique que l'apport principal de ces ions s'effectue sous la forme NaCl. Ils ne semblent pas impliqués dans le développement des biofilms présents dans cette station (Figure 128).

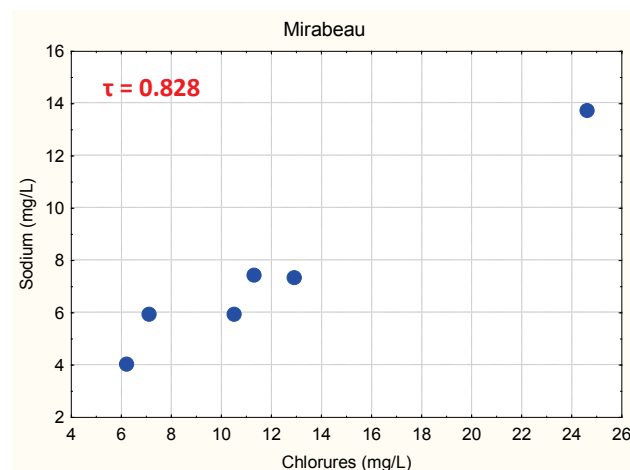


Figure 128 : Evolution des concentrations en chlorures et en sodium de l'eau ($n=6$). Le τ est le coefficient de corrélation de Kendall, il est en rouge lorsqu'il est significatif ($p \leq 0.05$).

Les phosphates, qui sont habituellement une espèce ionique favorisant le développement des organismes aquatiques même dans les biofilms : les nutriments (CNP) sont en effet limitants pour la production et l'activité algale et bactérienne (Chenier, *et al.*, 2003), n'ont pas l'effet attendu sur le développement bactérien du biofilm : bactéries_{totales}, bactéries_{cultivables}, *Lpn*_{totales} (Figure 129). Dans cette station, les phosphates sont importés depuis le bassin versant, majoritairement au cours des événements orageux. Cette information est confirmée par la tendance à l'augmentation simultanée de la concentration de ces ions et de la fréquence des $\Delta Q > 50\%$ au cours de la période de pré-incubation. On remarque que les concentrations en phosphates sont plus élevées en hiver qu'en été. Or en été, les phosphates favorisent le développement de micro-algues (Chenier, *et al.*, 2003), car nous sommes ici dans une station aérienne, les phosphates sont alors consommés, expliquant ainsi des concentrations inférieures à celles observées en hiver. A travers le processus de photosynthèse, les micro-algues vont alors favoriser la précipitation de CaCO_3 . Cette précipitation sur les substrats artificiels va, par la suite, être défavorable au développement de la communauté bactérienne du biofilm. Les eaux étant très calcaires, il est également possible que cette précipitation n'ait pas d'impact sur la concentration en calcium de l'eau. Cette hypothèse s'appuie également sur l'évolution de la fraction organique du biofilm en fonction de la concentration en phosphates qui évolue différemment en période chaude et en période froide, avec une fraction organique qui diminue, en été, lorsque la concentration en phosphates augmente (Figure 129).

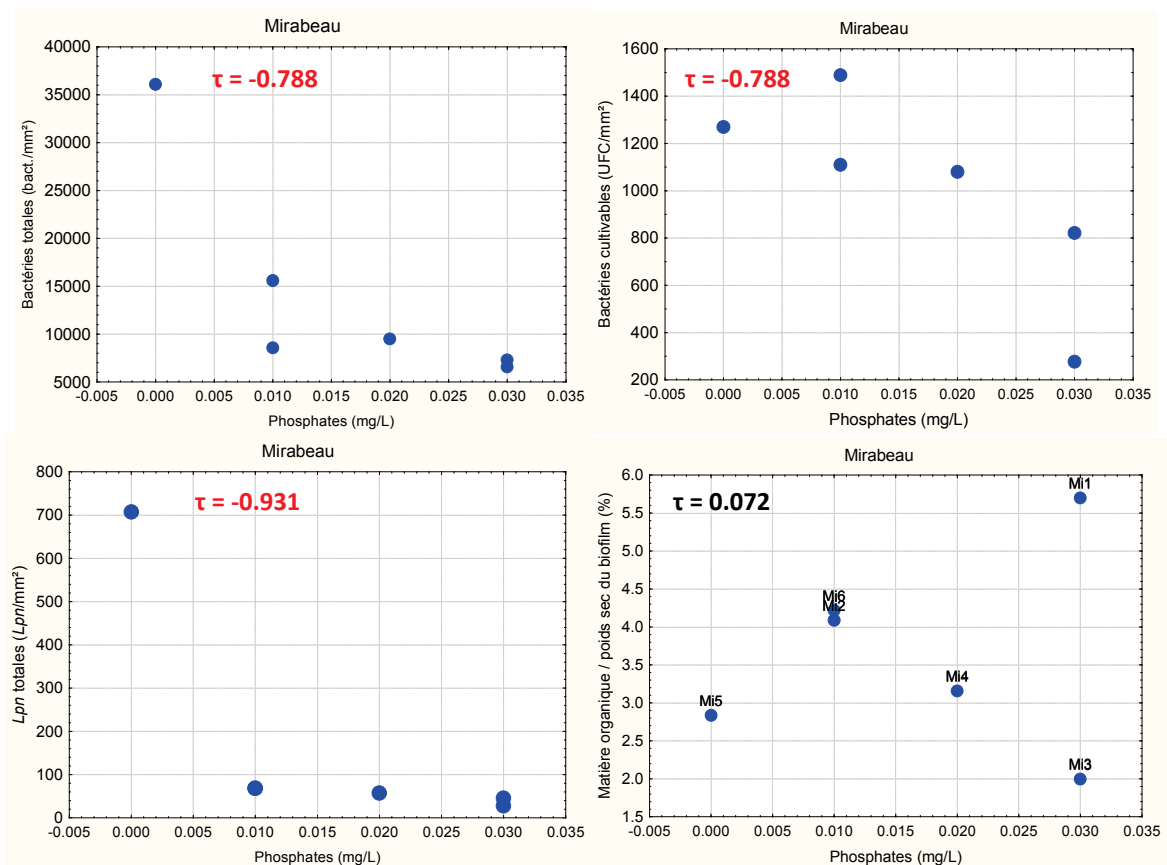


Figure 129 : Influence des ions phosphates sur les concentrations des bactéries_{totales}, des bactéries_{cultivables} et des *Lpn*_{totales} dans les biofilms de la station Mirabeau ainsi que sur l'importance de leur fraction organique (n=6). Le τ est le coefficient de corrélation de Kendall, il est en rouge lorsqu'il est significatif ($p \leq 0.05$). Codes des campagnes 1: décembre 07, 2: juin 08, 3: septembre 08, 4: décembre 08, 5: mars 09, 6: juin 09.

Ainsi, dans cette station de référence, chaque descripteur physico-chimique apparaît agir de façon isolée sur l'un ou l'autre des descripteurs biologiques. Par ailleurs, les corrélations entre les descripteurs biologiques sont rares : les bactéries_{totales}, les bactéries_{cultivables} et les Lpn_{totales} semblent varier dans le même sens. Les bactéries_{cultivables} augmentent avec l'augmentation des bactéries_{totales} jusqu'à un seuil à partir duquel la concentration des bactéries_{cultivables} semble ne plus changer (Figure 130).

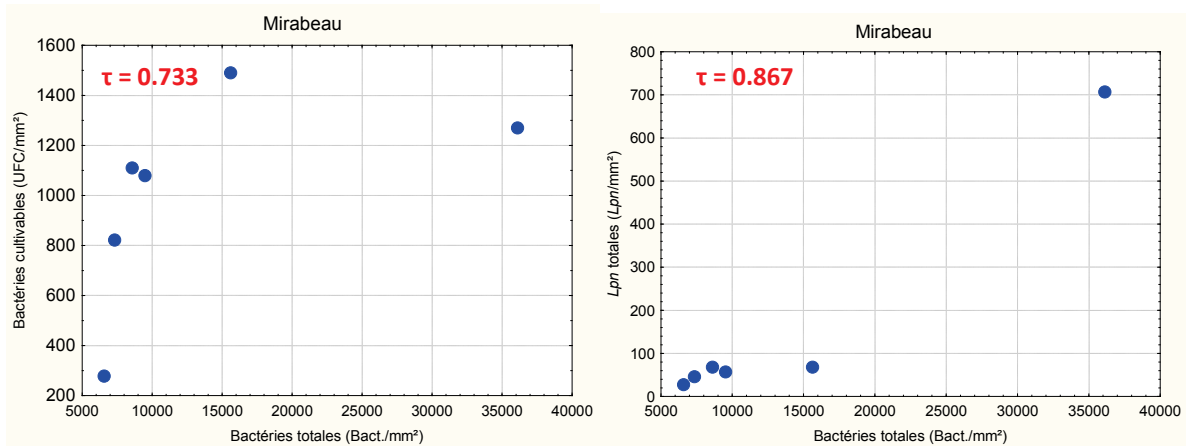


Figure 130 : Evolution des bactéries_{cultivables} et des Lpn_{totales} en fonction de la concentration en bactéries_{totales} (n=6). Le τ est le coefficient de corrélation de Kendall, il est en rouge lorsqu'il est significatif ($p \leq 0.05$).

Il apparaît en conclusion, que le développement des biofilms dans cette station dépend principalement des paramètres physico-chimiques. Cette observation rejoint celle faite à propos de chacune des stations du bassin versant (§ 5.7).

6.2.2.2 Station Parking

Comme la station Mirabeau, la station Parking constitue à elle seule l'un des groupes de données définis au paragraphe 6.2.1, en partie à cause de son emplacement entre les apports provenant des sources thermales et le rejet de l'établissement thermal. Malgré les apports réguliers provenant des sources Alun et Soufre, le profil de température montre des variations nyctémérales analogues à celles de la station Mirabeau (Figure 87), variations qui disparaissent ensuite à la station Liège. Le changement de régime thermique entre les deux stations conforte notre choix d'associer la station Liège aux deux stations les plus en aval plutôt qu'à la station Parking.

Le calcul des coefficients de corrélation montre que la station Parking, présente également une particularité par le fait que le facteur température n'a d'influence significative ni sur le développement du biofilm en général, ni sur la présence des différentes formes de Lpn .

L'influence des débits sur le développement du biofilm est plutôt indirecte : en effet, à partir d'une valeur seuil, le débit médian de la période de pré-incubation est positivement corrélé aux rapports "bactéries_{totales} / amibes" et "*Lpn*_{totales} / amibes" (Figure 131). Ces rapports peuvent varier à travers la hausse des concentrations de bactéries et de *Lpn*_{totales} ou par la baisse des concentrations d'amibes, ou les deux simultanément, comme dans le cas de la multiplication intra-cellulaire de *Lpn* qui provoque l'éclatement des amibes. Il est également possible que le débit de la période précédant l'incubation puisse conduire à des conditions physico-chimiques favorisant l'enkystement des amibes. La présence de certains ions tels que Mg^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , pression partielle en CO_2 élevée, carence nutritive et plus particulièrement en glucose, ou la présence de résidus galactose peuvent favoriser l'enkystement (Aguilar-Díaz, *et al.*, 2011). Les kystes pourraient ensuite intégrer passivement les biofilms où ils n'exerceraient évidemment pas de prédation sur les bactéries. La multiplication bactérienne et celle de *Lpn* serait alors plus importante que celle des amibes, causant ainsi l'augmentation des rapports. Cette hypothèse est valable dans le cas où les *Lpn* des biofilms seraient capables de se multiplier sans développement intra-cellulaire dans les amibes, ou si elles utilisent d'autres organismes pour leur multiplication intra-cellulaire. Une troisième hypothèse pourrait expliquer les variations de ces deux rapports : sachant que le passage de l'eau dans les tubes supports des substrats artificiels facilite la sédimentation, lorsque la charge particulaire de l'eau est importante, le dépôt qui se produit sur les substrats vierges est lui aussi important et pourrait limiter leur colonisation par les amibes (à travers le phénomène de compétition pour l'espace).

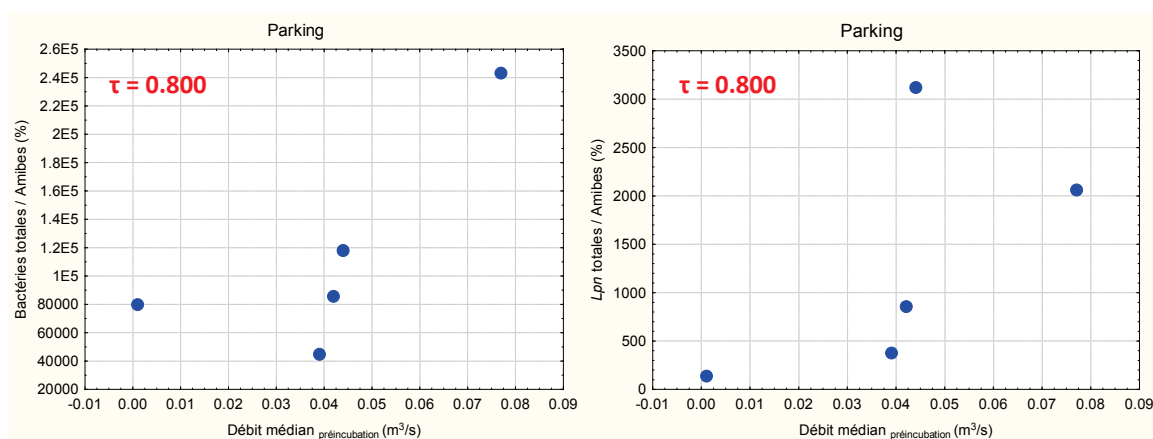


Figure 131 : Influence du débit médian de la période de pré-incubation sur les rapports bactéries_{totales} / amibes et *Lpn*_{totales} / amibes (n=6). Le τ est le coefficient de corrélation de Kendall, il est en rouge lorsqu'il est significatif ($p \leq 0.05$).

Le débit médian de la période d'incubation est, quant à lui, corrélé à la concentration en potassium de l'eau (Figure 132). Un enrichissement en potassium correspond à une diminution de la concentration d'amibes mais il favorise la forme cultivable des bactéries du groupe "*Pseudomonas* et bactéries apparentées" (Figure 133). Ces deux effets sont particulièrement marqués à partir d'une concentration en potassium de 2 mg/L.

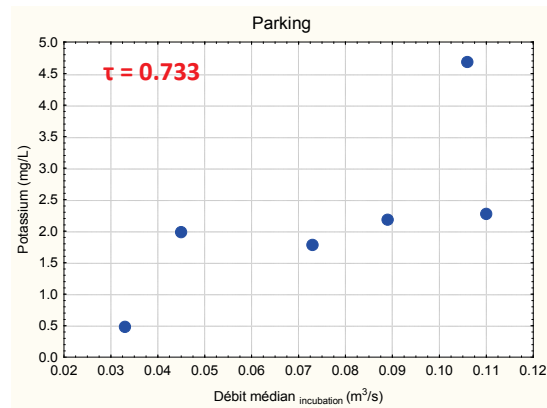


Figure 132 : Influence du débit médian de la période d'incubation sur la concentration en potassium de l'eau à la station Parking (n=6). Le τ est le coefficient de corrélation de Kendall, il est en rouge lorsqu'il est significatif ($p \leq 0.05$).

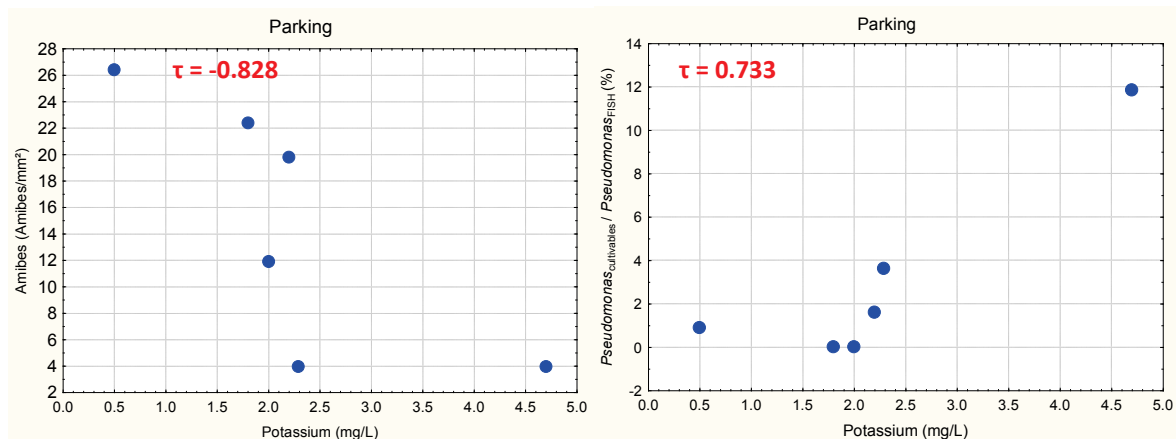


Figure 133 : Influence de la concentration en potassium de l'eau sur les concentrations d'amibes et sur la proportion des formes cultivables de "*Pseudomonas* et des bactéries apparentées" à la station Parking (n=6). Le τ est le coefficient de corrélation de Kendall, il est en rouge lorsqu'il est significatif ($p \leq 0.05$).

L'augmentation du débit médian sur l'ensemble des deux périodes (pré-incubation et incubation) accroît la fraction organique du biofilm ainsi que les deux rapports bactéries_{totales}/amibes et $Lpn_{totales}$ /amibes (Figure 134). Rappelons que ces deux rapports sont également influencés par le débit médian de la période de pré-incubation (Figure 131). Les hypothèses formulées à ce sujet devraient pouvoir s'appliquer à l'interprétation de l'effet du débit médian de l'ensemble des deux périodes.

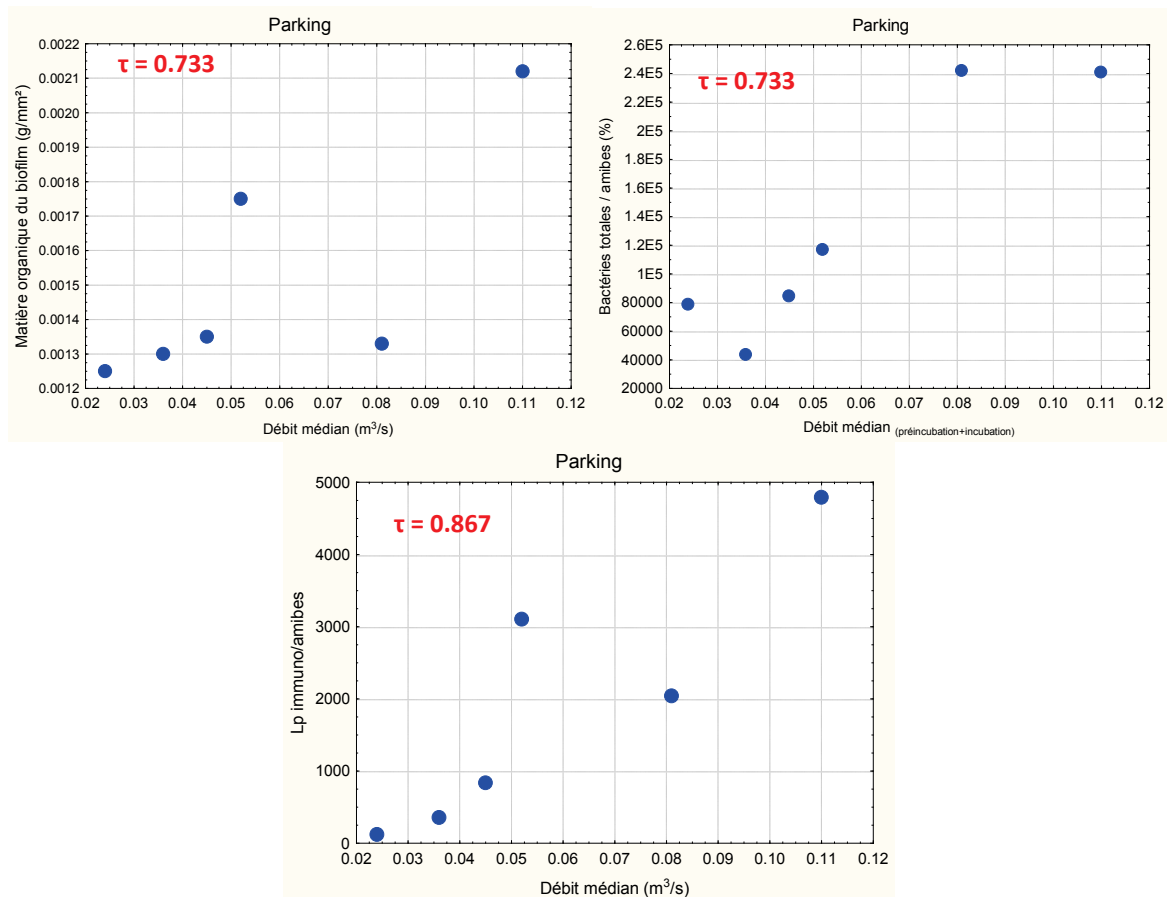


Figure 134 : Influence du débit médian_(pré-incubation + incubation) sur la concentration en matière organique ainsi que sur les rapports bactéries_{totales}/amibes et $Lp_{n_{totales}}$ /amibes (n=6). Le τ est le coefficient de corrélation de Kendall, il est en rouge lorsqu'il est significatif ($p \leq 0.05$).

Seul le débit médian a pu être considéré ici, car la fréquence des variations significatives de débit a été trop faible pour pouvoir être interprétée. En effet, seules deux campagnes ont présenté de telles variations de débit.

Le pH est corrélé à des descripteurs biologiques (Figure 135). Les eaux à caractère acide sont associées à un plus grand développement bactérien dans les biofilms et, plus particulièrement, des bactéries du groupe "*Pseudomonas* et bactéries apparentées", à la fois en termes de concentration et de proportion au sein de la communauté bactérienne. Les eaux à caractère basique sont, elles, caractéristiques de l'augmentation des proportions de flagellés vis-à-vis de la communauté bactérienne se traduisant par la hausse des rapports flagellés/bactéries_{totales} et flagellés/bactéries_{cultivables}.

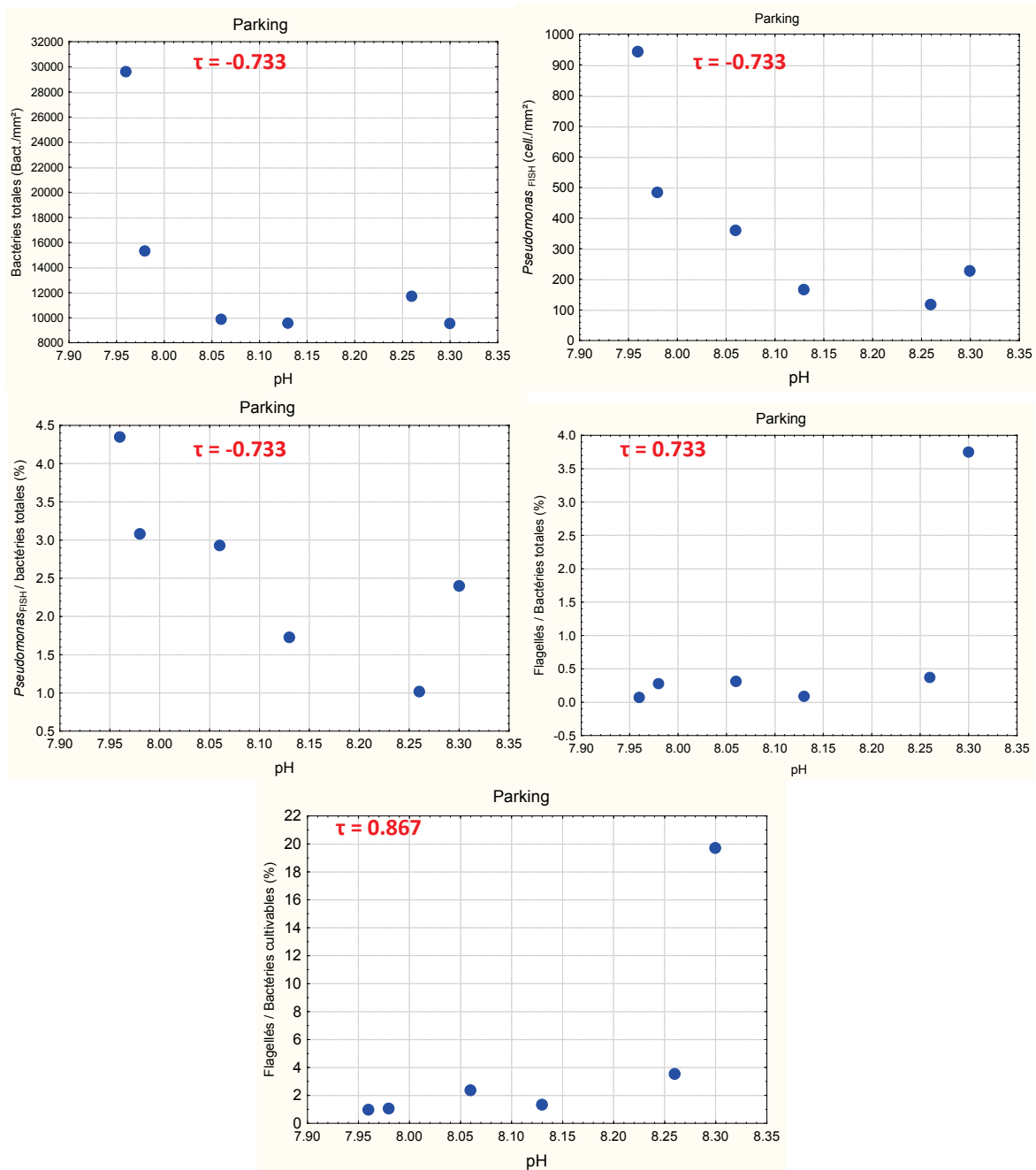


Figure 135 : Influence du pH sur le développement des biofilms à la station Parking (bactéries_{totales}, concentration et proportion des bactéries du groupe "*Pseudomonas*_{FISH} et bactéries apparentées", proportions flagellés – bactéries ; n=6). Le τ est le coefficient de corrélation de Kendall, il est en rouge lorsqu'il est significatif ($p \leq 0.05$).

La conductivité, au niveau de cette station Parking, s'explique principalement à travers les variations des concentrations en ions chlorures, mais les autres espèces ioniques vont également l'influencer, en particulier lorsqu'elle dépasse 550 $\mu\text{S}/\text{cm}$. La conductivité est positivement corrélée avec le pourcentage de matière organique présente dans les biofilms de cette station (Figure 136).

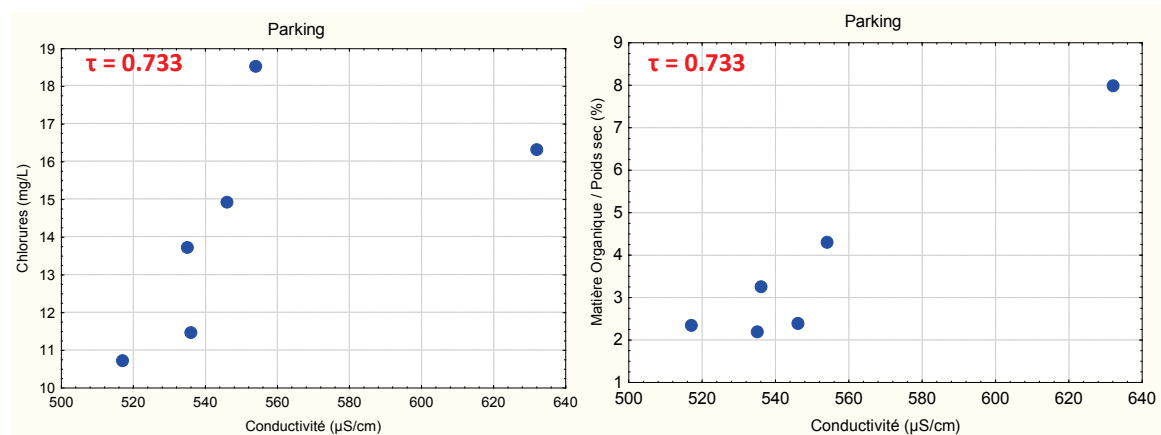


Figure 136 : Importance des ions chlorures dans la mesure de la conductivité et relation entre la conductivité et l'importance de la fraction organique des biofilms (n=6). Le τ est le coefficient de corrélation de Kendall, il est en rouge lorsqu'il est significatif ($p \leq 0.05$).

Les autres ions qui semblent être en relation avec le développement des biofilms sont : les nitrates, le sodium, les phosphates et le calcium (Figure 137). Certains de ces ions sont corrélés entre eux. C'est le cas des nitrates négativement corrélés au sodium et aux sulfates. Contrairement aux sulfates qui sont caractéristiques des arrivées d'eaux thermales (Tableau 6), les nitrates proviennent principalement du bassin versant et caractérisent ainsi l'hydrodynamisme du cours d'eau. Les sulfates ont tendance à évoluer dans le même sens que la forme cultivable des bactéries du groupe "*Pseudomonas* et bactéries apparentées". Le sodium varie à l'inverse du poids sec du biofilm. Le poids sec est lui-même positivement corrélé à la concentration des bactéries du groupe "*Pseudomonas*_{FISH} et bactéries apparentées". Le calcium varie dans le même sens du rapport flagellés / bactéries_{cultivables} jusqu'à 100 ppm. Il est à noter la faible valeur du rapport obtenue en regard de la concentration de 219 ppm observée en décembre 2008 à la station Parking.

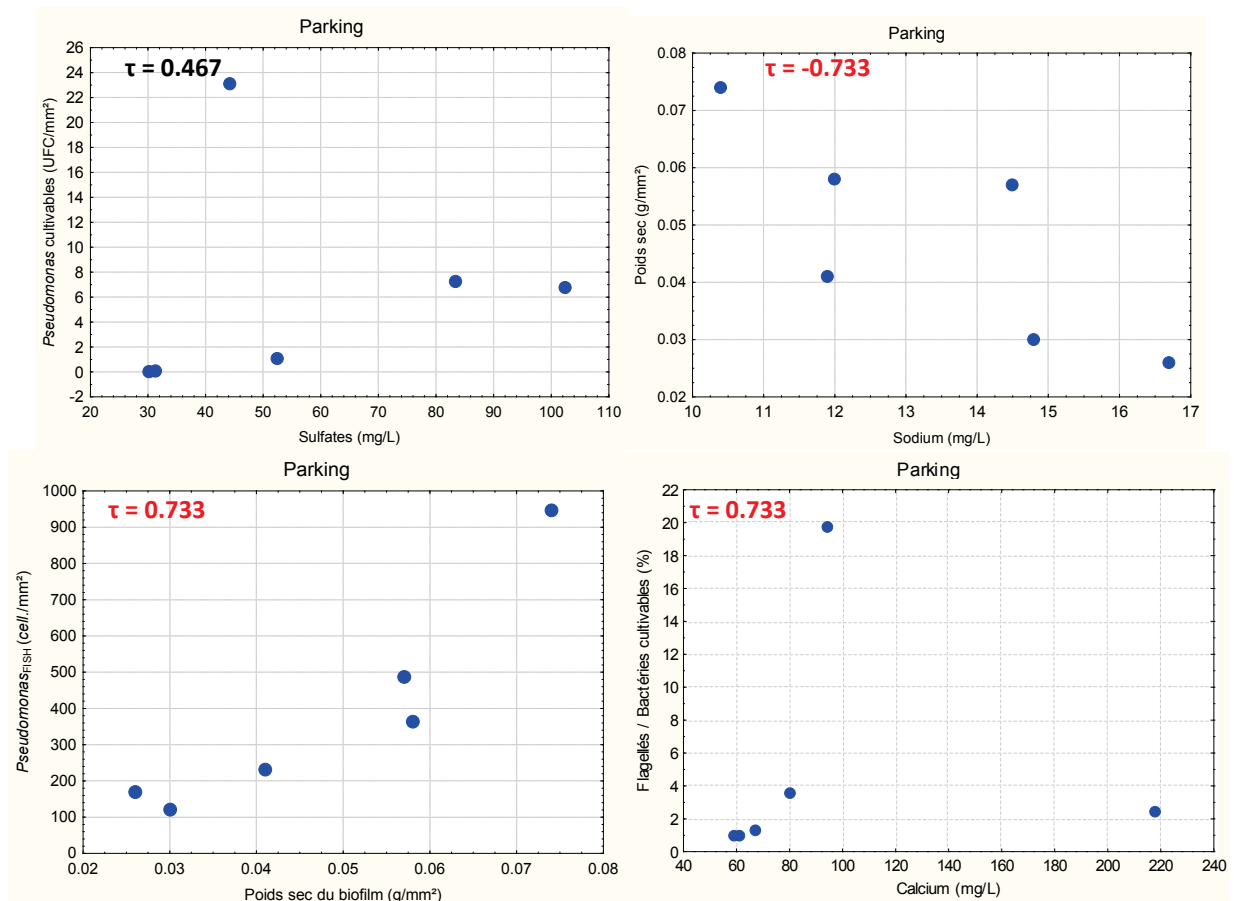


Figure 137 : Influence des espèces ioniques, sulfates, sodium, calcium et du poids sec sur le développement des biofilms (n=6). Le τ est le coefficient de corrélation de Kendall, il est en rouge lorsqu'il est significatif ($p \leq 0.05$).

Le COD présente une évolution opposée à celle du rapport flagellés / bactéries_{cultivables} (Figure 138), suggérant ainsi que la présence de COD dans l'eau favorise la multiplication des bactéries cultivables sans pour autant permettre une multiplication aussi efficace des flagellés présents dans le biofilm. La baisse de ce rapport peut également s'expliquer par une diminution de la pression de prédation des flagellés sur la communauté bactérienne cultivable.

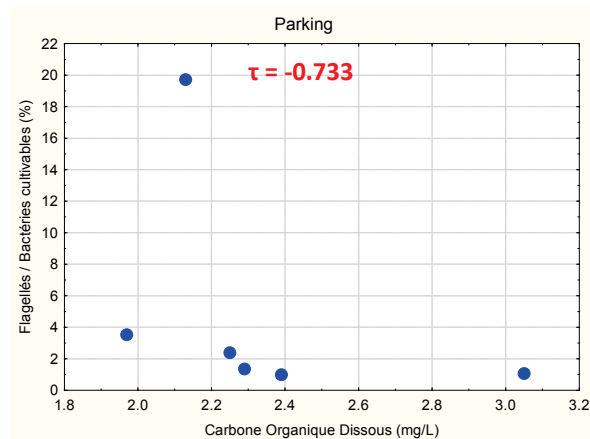


Figure 138 : Influence du COD de l'eau sur les proportions de flagellés par rapport aux bactéries_{cultivables} (n=6). Le τ est le coefficient de corrélation de Kendall, il est en rouge lorsqu'il est significatif ($p \leq 0.05$).

La concentration de matière organique du biofilm influence le développement bactérien (Figure 139). Les biofilms pour lesquels la concentration en matière organique est la plus importante apparaissent comme les plus contaminés par Lpn_{totales} , leur communauté bactérienne est également la moins cultivable. La représentation des bactéries_{cultivables} en fonction de la concentration de matière organique du biofilm, met en évidence deux groupes d'échantillons : le groupe correspondant aux campagnes de décembre 2007, de septembre 2008 et de mars 2009 et le groupe des campagnes de juin 2008, décembre 2008 et juin 2009. Un effet saisonnier ne permet pas d'expliquer la répartition au sein de ces groupes.

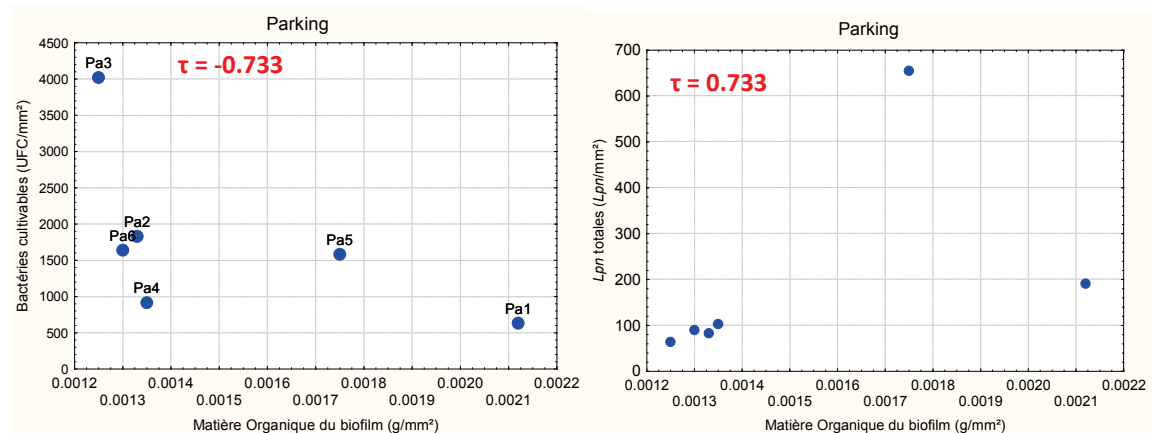


Figure 139 : Relation entre la concentration en matière organique du biofilm et la concentration de bactéries_{cultivables} et de Lpn_{totales} (n=6). Le τ est le coefficient de corrélation de Kendall, il est en rouge lorsqu'il est significatif ($p \leq 0.05$).

Codes des campagnes : 1: décembre 07, 2: juin 08, 3: septembre 08, 4: décembre 08, 5: mars 09, 6: juin 09.

Seuls deux descripteurs biologiques sont significativement corrélés entre eux : il s'agit de Lpn_{totales} et des bactéries cultivables (Figure 140). En effet, les conditions défavorables aux bactéries_{cultivables} favorisent la présence de Lpn_{totales} . C'est le cas, par exemple, de la concentration en matière organique du biofilm, comme cela a été présenté Figure 139.

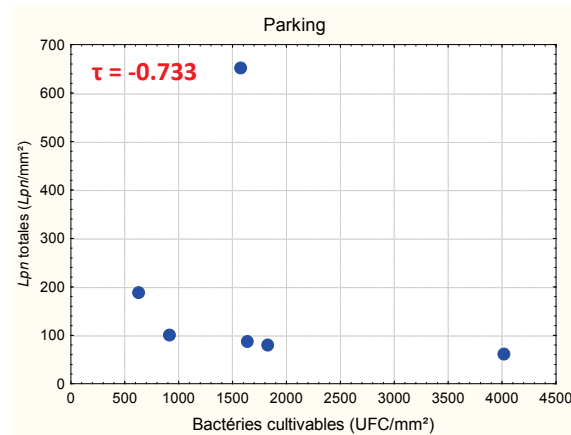


Figure 140 : Relation entre les concentrations de Lpn_{totales} et des bactéries cultivables ($n=6$). Le τ est le coefficient de corrélation de Kendall, il est en rouge lorsqu'il est significatif ($p \leq 0.05$).

En conclusion, comme pour la station Mirabeau, le développement des biofilms de la station Parking est principalement contrôlé par des paramètres physico-chimiques. Seuls les débits médians ainsi que la concentration en matière organique du biofilm semblent influencer les concentrations de Lpn dans cette station située à l'aval immédiat de la confluence avec les sources thermales. La forme cultivable de Lpn ne semble influencée par aucun des descripteurs considérés dans cette partie de l'étude.

6.2.2.3 Groupe des stations situées à l'aval de l'ensemble des arrivées d'eaux thermales en période froide

Il s'agit des trois stations Liège, Lepic et Aquarium considérées ici en période froides. L'ACP effectuée précédemment à partir des caractéristiques physico-chimiques a montré en effet qu'il était possible de considérer ces trois stations ensemble tout en distinguant une saison froide (décembre 2007 et 2008 et mars 2009) d'une saison chaude (juin 2008, septembre 2008 et juin 2009).

L'observation visuelle des cours d'eau effectuée lors des prélèvements a constamment montré, que les contraintes dues aux forces de cisaillements à la station Liège étaient plus importantes qu'aux stations Lepic et Aquarium. Comme cela a été évoqué dans le paragraphe 6.1.4, la différence de vitesse permet d'expliquer les particularités de cette station vis-à-vis des autres stations :

- concentration bactérienne inférieure
- plus grandes proportions de Lpn ,
- fraction organique moins importante avec une précipitation de carbonate de calcium visuellement plus marquée (Figure 80).

Les ciliés sont peu présents dans les biofilms de ces trois stations durant les périodes froides. Leur présence correspond à des conditions physico-chimiques particulières résumées dans le Tableau 85. Rappelons ici que l'analyse de l'influence de ces descripteurs a été faite en les considérant isolément les uns des autres. Ils correspondent également à une concentration de "*Pseudomonas* cultivables et de bactéries apparentées" supérieure à 4 UFC/mm².

Tableau 85 : Caractéristiques du milieu correspondant à la présence de ciliés dans les biofilms des stations Liège, Lepic Aquarium au cours de la période froide.

Débit pré-incubation ou incubation	> 0.10 m³/s
Degré jour	>200
Conductivité	>610 µS
Sodium	>12 mg/l
Chlorures	>16.5 mg/L
pH	>8.17

D'une manière générale, on observe de nombreuses corrélations faisant uniquement intervenir des descripteurs physico-chimiques. Quelques corrélations sont tout de même mises en évidence entre certains descripteurs biologiques. On remarque également que les facteurs physico-chimiques suivis ici sont plus fréquemment corrélés à des rapports entre descripteurs biologiques qu'aux descripteurs biologiques eux-mêmes.

Le débit médian, au cours de chacune des périodes de pré-incubation et d'incubation, est corrélé à une augmentation de la quantité de chaleur vue par le biofilm (degré jour). La corrélation est plus significative et plus linéaire lorsque l'on considère le débit de la période de pré-incubation plutôt que celui de la période d'incubation ($r = 0.91$ et 0.81 respectivement). Cette augmentation de "chaleur cumulée" simultanément à l'augmentation des débits est surprenante pour la saison. Les valeurs maximales sont observées au cours des campagnes des mois de décembre, au moment d'une période d'arrêt de l'exploitation de la ressource thermique, et du nettoyage approfondi de l'établissement incluant celui de son réseau interne d'eaux thermales. Le processus de nettoyage passe par une vidange de la bêche de rejet, l'évacuation des boues de ce bassin, mais également par des chocs thermiques. Les eaux rejetées à cette époque peuvent donc être plus chaudes que lors des périodes d'exploitation et entraîner de ce fait une augmentation de la température de l'eau, en aval, dans le cours d'eau.

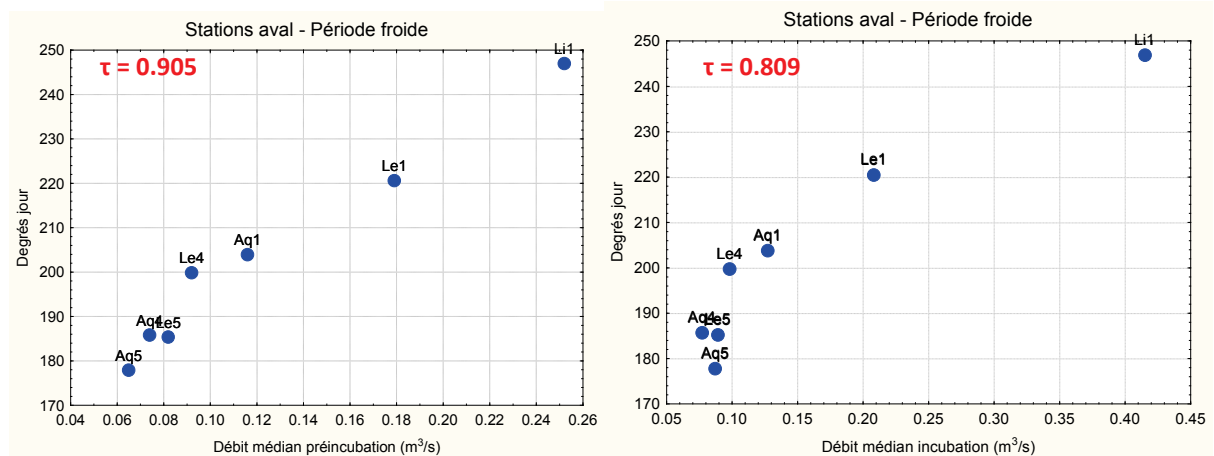


Figure 141 : Influence des débits médians des périodes de pré-incubation et d'incubation sur la quantité de chaleur vue par le biofilm (n=7). Le τ est le coefficient de corrélation de Kendall, il est en rouge lorsqu'il est significatif ($p \leq 0.05$).

Codes des stations : Li : Liège ; Le : Lepic ; Aq : Aquarium ;

Codes des campagnes : 1 : Décembre 07 ; 4 : Décembre 08 ; 5 : mars 09.

Au cours de la période d'incubation, un débit supérieur à 0.10 m³/s est associé à des eaux qui tendent à prendre un caractère alcalin (Figure 142). Sachant que les eaux des sources thermales ont un pH proche de la normalité, il est peu probable qu'elles participent à l'augmentation du débit, sauf si on fait l'hypothèse que les produits utilisés pour le nettoyage du réseau de l'établissement soient responsables d'une augmentation du pH de l'eau rejetée. Les augmentations du débit peuvent aussi être liées au lessivage du bassin versant. Dans ce cas, la tendance à l'alcalinisation des eaux du cours d'eau serait l'indication du fait que le pH des eaux de ruissellement tend, lui aussi, à être supérieur à la neutralité.

L'augmentation des débits correspond également à un enrichissement en chlorures, en sodium et à une augmentation de la conductivité, ce qui va dans le sens d'un enrichissement à travers un apport plus important d'eaux thermales (Figure 142). Jusqu'à une valeur de 0.13 m³/s, les débits favorisent la présence de bactéries du groupe "*Pseudomonas*_{cultivables} et bactéries apparentées". Ce qui se fait également ressentir lorsque l'on considère les rapports "*Pseudomonas*_{cultivables} et bactéries apparentées"/bactéries_{cultivables} et "*Pseudomonas*_{cultivables} et bactéries apparentées"/"*Pseudomonas*_{FISH} et bactéries apparentées". Il est possible que l'action du débit sur les concentrations et les proportions du groupe "*Pseudomonas* et bactéries apparentées" s'effectue à travers les modifications chimiques du cours d'eau. Le débit médian de la période d'incubation a tendance à favoriser *Lpn*_{totales} par rapport aux bactéries_{totales}, mais ce résultat devra être confirmé (Figure 142). Cette tendance peut s'expliquer à travers une multiplication intra-amibienne des légionelles qui les protégerait des forces de cisaillement et donc d'un arrachage du substrat. Il est également possible que les débits plus importants permettent un meilleur passage de l'eau dans les canaux de la base des biofilms avec pour conséquence une meilleure oxygénation et un meilleur renouvellement des nutriments. Dans ce cas, la stimulation toucherait l'ensemble des microorganismes des biofilms.

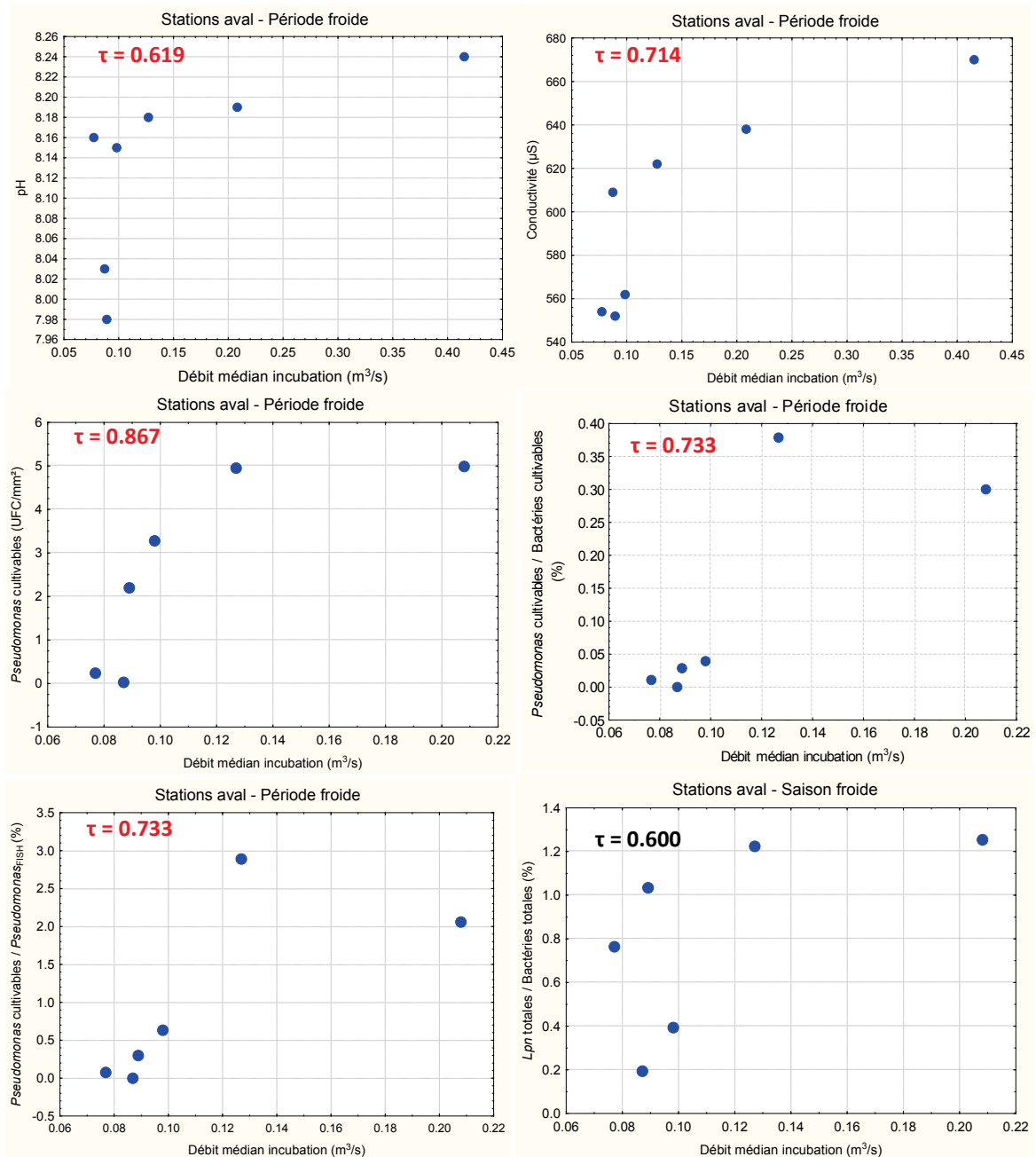


Figure 142 : influence du débit médian de la période d'incubation sur la conductivité, le pH, les bactéries du groupe "*Pseudomonas*_{cultivables} et bactéries apparentées" et *Lpn*_{totales} (n=6). Le τ est le coefficient de corrélation de Kendall, il est en rouge lorsqu'il est significatif ($p \leq 0.05$).

Les mêmes corrélations existent avec le débit médian au cours de la période de pré-incubation. La relation entre le débit et la proportion de *Lpn*_{totales}, observée précédemment pour la période d'incubation, se renforce même pour devenir une corrélation significative et positive (Figure 143). La relation entre ces deux descripteurs est alors de type logarithmique.

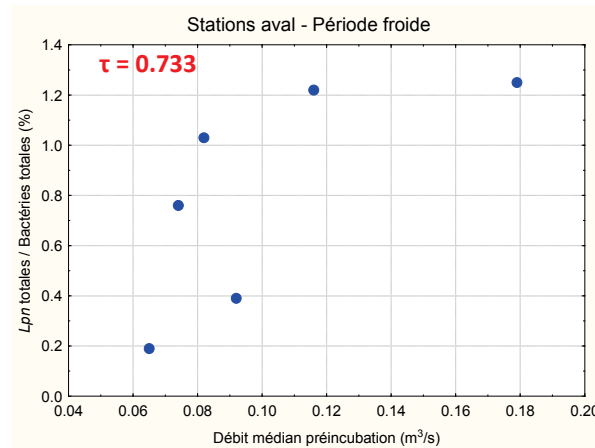


Figure 143 : Influence du débit de la période précédant l'incubation sur les proportions en *Lpn* des bactéries du biofilm (n=6). Le τ est le coefficient de corrélation de Kendall, il est en rouge lorsqu'il est significatif ($p \leq 0.05$).

L'effet de la température peut être considéré à travers la valeur médiane de ce descripteur ou le degré jour.

Durant ces campagnes de période froide, l'augmentation de la température est associée à une hausse de la concentration des bactéries du groupe "*Pseudomonas*_{cultivables} et bactéries apparentées" (Figure 144). La température et le pH varient également de manière simultanée : plus les eaux de cette partie du réseau sont froides, plus elles ont tendance à s'acidifier. Ceci confirme la première observation effectuée le long du réseau qui mettait en évidence une acidification de l'eau à l'aval de l'arrivée des sources, puis une hausse du pH liée aux rejets provenant de la bâche suivi d'une nouvelle acidification à l'aval de la confluence avec le Tillet (Figure 95). En décembre 2007, on note une baisse des débits le long du réseau, ce qui mène à une corrélation positive avec la température, comme c'est également le cas avec les degrés jour (Figure 141 et Figure 144). Il est possible, qu'en hiver, le niveau du lac influence le débit mesuré au niveau de la station Aquarium, ou que la courbe de tarage effectuée à la station Liège surestime le débit obtenu pour les hauteurs d'eau les plus importantes.

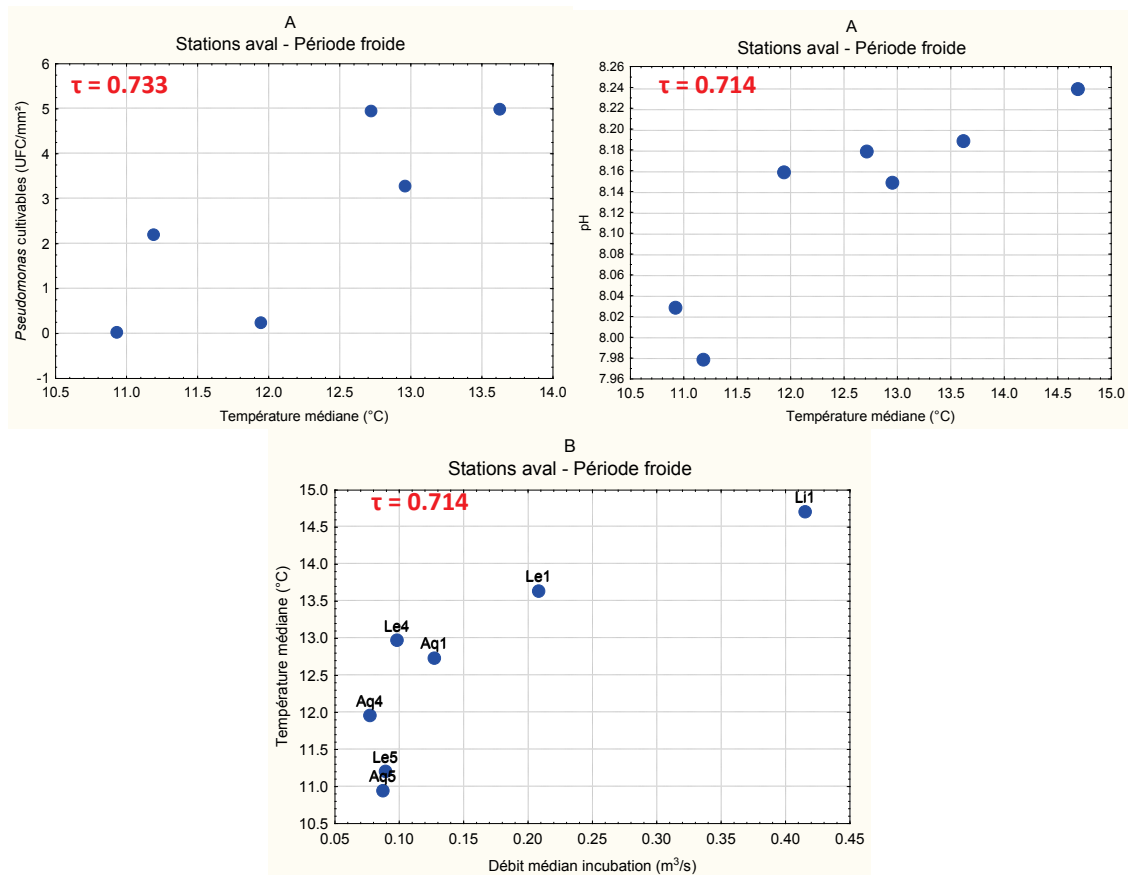


Figure 144 : A : Relation entre, d'une part la température médiane, et d'autre part le pH et la concentration de "*Pseudomonas*_{cultivables} et de bactéries apparentées". B : Relation entre le débit médian durant la période d'incubation et la température médiane (n=7).

Le τ est le coefficient de corrélation de Kendall, il est en rouge lorsqu'il est significatif ($p \leq 0.05$).

Codes des stations : Li : Liège ; Le : Lepic ; Aq : Aquarium ;

Codes des campagnes : 1 : Décembre 07 ; 4 : Décembre 08 ; 5 : mars 09

L'utilisation du degré jour fait également apparaître une corrélation plus forte avec le pH (Figure 145), que lorsque l'on considère la température médiane. Des corrélations positives avec les concentrations des ions chlorures et sodium apparaissent, mais restent faibles ($\tau=0.53$). C'est également le cas avec la conductivité et la concentration de "*Pseudomonas*_{cultivables} et des bactéries apparentées".

Ces résultats montrent que la considération de la température à travers sa valeur médiane ou les degrés jour amène des différences dans les corrélations obtenues ce qui traduit une inertie des processus mis en jeu.

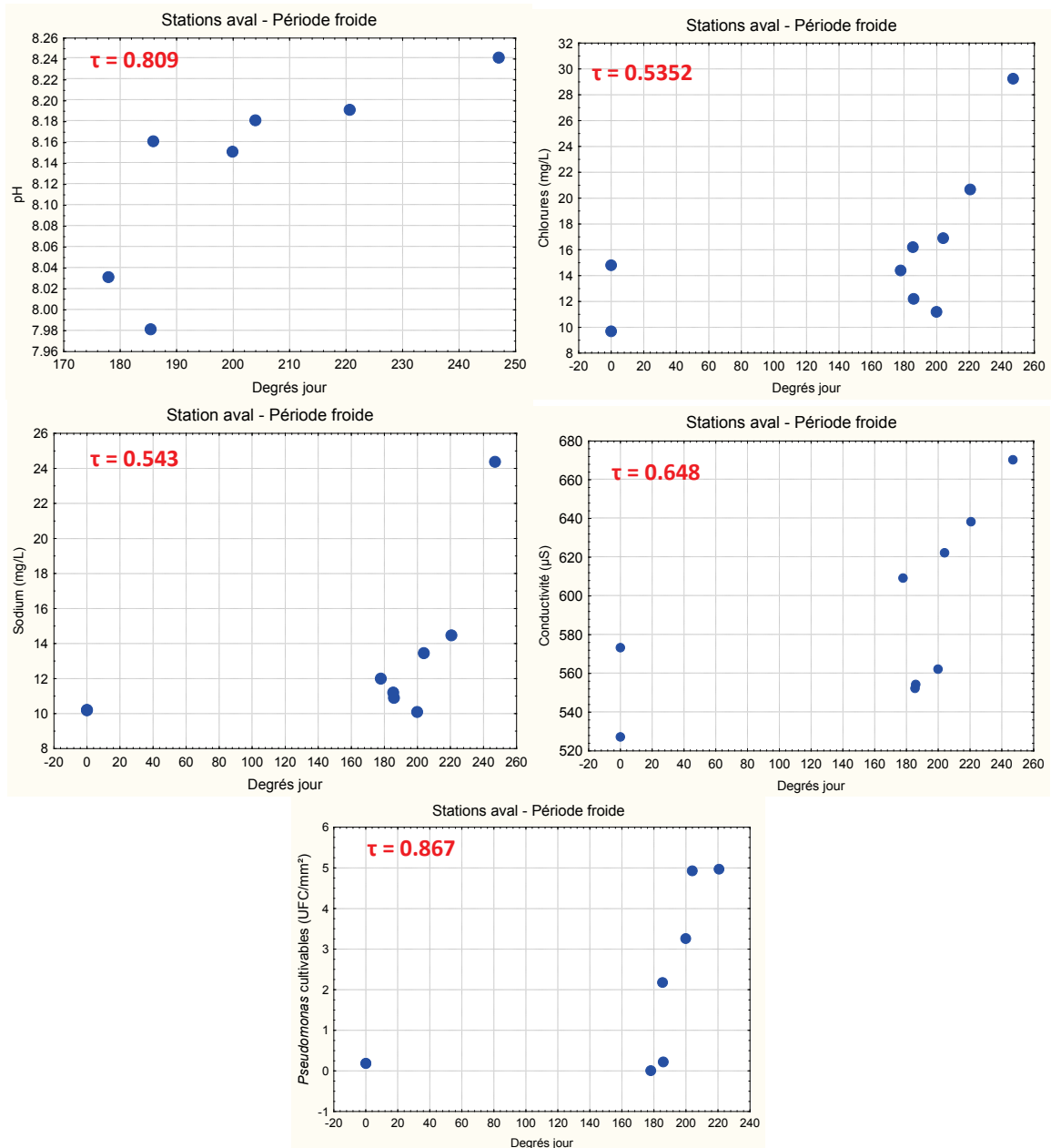


Figure 145 : Relation entre la quantité de chaleur apportée par la rivière au cours de l'incubation (degrés jour) d'une part et, d'autre part le pH, les concentrations des ions chlorures et sodium, la conductivité de l'eau et la concentration des bactéries du groupe "*Pseudomonas*_{cultivables} et bactéries apparentées" du biofilm (n=7). Le τ est le coefficient de corrélation de Kendall, il est en rouge lorsqu'il est significatif ($p \leq 0.05$).

Comme cela a déjà été évoqué précédemment, le pH varie avec le débit, lorsque celui-ci est supérieur à $0.10 \text{ m}^3/\text{s}$, et avec la température (Figure 142 et Figure 144). De plus, les variations de pH sont positivement corrélées à celles des concentrations de sulfates, dont l'origine est principalement thermique (Figure 146). Une corrélation positive est également observée avec la concentration de magnésium, dont la teneur est plus élevée dans les eaux thermales. Le pH est donc soumis aux mêmes influences que les autres descripteurs physico-chimiques qui, tous associés, peuvent avoir un impact sur le développement du biofilm.

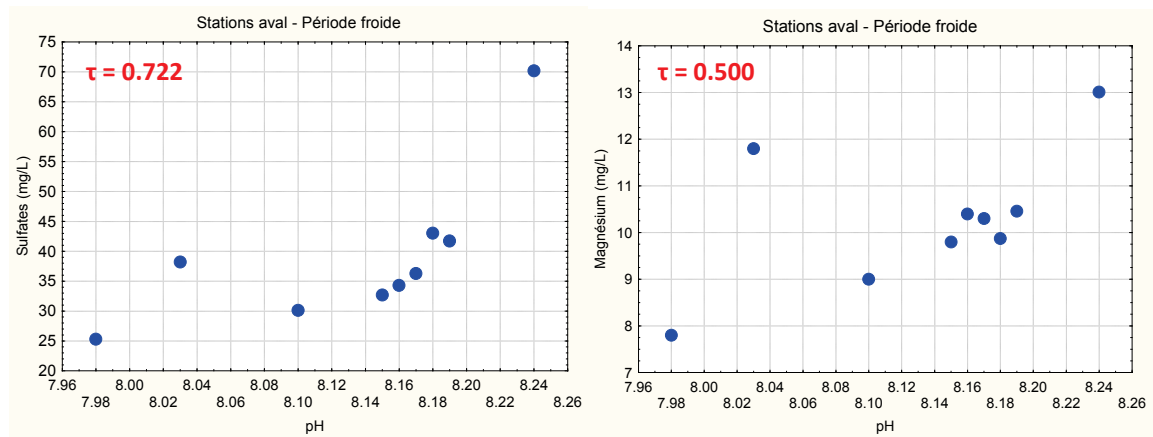


Figure 146 : Relation entre le pH et les concentrations de sulfates et de magnésium (n=9). Le τ est le coefficient de corrélation de Kendall, il est en rouge lorsqu'il est significatif ($p \leq 0.05$).

L'augmentation de la concentration en COD de l'eau coïncide avec une baisse de la température du cours d'eau (Figure 147). Ceci confirme les observations effectuées précédemment, concernant les apports de COD par les eaux du Tillet et par un apport non identifié entre les stations Lepic et Aquarium (Figure 96). Les eaux les plus riches en COD correspondent également aux eaux les plus riches en phosphates (Figure 147). La concentration de COD est corrélée à un seul descripteur biologique du biofilm : la proportion des bactéries du groupe "*Pseudomonas*_{FISH} et bactéries apparentées" dans la communauté bactérienne. Il s'agit d'une corrélation négative.

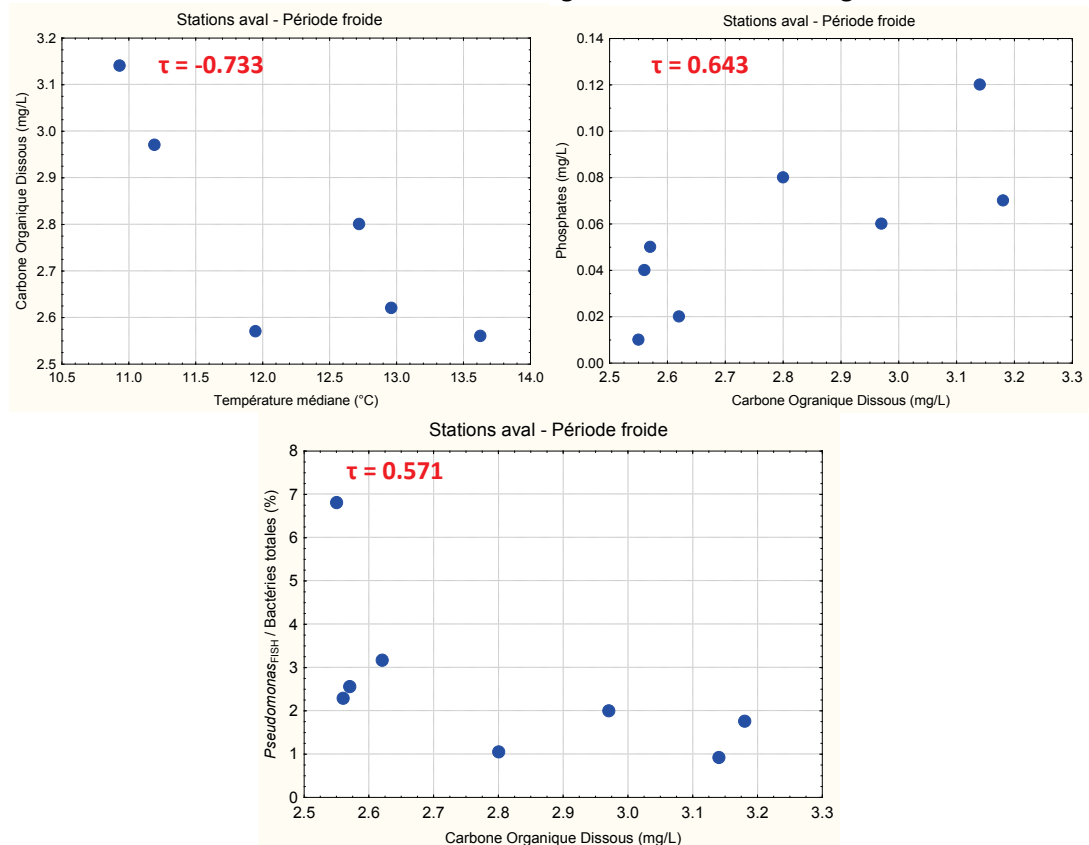


Figure 147: Impact de la température sur la concentration en COD de l'eau et relation entre la concentration en COD et la concentration en phosphates ainsi qu'entre le COD et la proportion de bactéries du groupe "*Pseudomonas*_{FISH} et bactéries apparentées" du biofilm. (n=6 à 8). Le τ est le coefficient de corrélation de Kendall, il est en rouge lorsqu'il est significatif ($p \leq 0.05$).

Sur cette partie du réseau, la conductivité est principalement corrélée avec les concentrations de sodium, chlorures, sulfates et calcium. Comme cela a été évoqué précédemment elle varie également avec le débit et la température (Figure 142 et Figure 145). Les variations de conductivité semblent donc être liées aux arrivées d'eaux thermales.

Les concentrations de nombreuses espèces ioniques sont corrélées entre elles, mettant ainsi en évidence la possibilité d'une origine commune qui serait les eaux thermales. C'est le cas des chlorures, phosphates, sodium, sulfates, magnésium et potassium (Figure 148). Les nitrates ne sont pas corrélés avec les autres ions ; en effet, ils sont rares dans l'eau des sources et proviennent donc principalement du bassin versant. Leur concentration est corrélée positivement à la proportion de matière organique du biofilm. Notons l'existence d'une différence importante entre la station Liège et les stations Lepic et Aquarium à la fois en termes de concentration en nitrates et de proportion de matière organique, ce qui confirme un apport de COD et de nitrates par les eaux du Tillet et plus généralement par le bassin versant. Enfin, la concentration des nitrates est négativement corrélée au poids sec du biofilm (Figure 148).

Les phosphates sont négativement corrélés à la proportion de "*Pseudomonas*_{FISH} et de bactéries apparentées" mais aussi, globalement, à la proportion de bactéries_{cultivables} (Figure 148). L'origine de cet ion semble complexe : il peut être en partie apporté par les eaux thermales et en partie par le bassin versant y compris sous forme de déversements ponctuels d'eaux usées, parfois observés, dans la partie souterraine du réseau.

Une hausse de la concentration de magnésium apparaît associée à une diminution de la concentration de *Lpn*_{totales} (Figure 148), malgré une exception lors de la campagne de décembre 2008, au cours de laquelle la corrélation entre les deux descripteurs est positive.

Le calcium est négativement corrélé à la concentration et à la proportion de bactéries du groupe "*Pseudomonas*_{cultivables} et bactéries apparentées" (Figure 148).

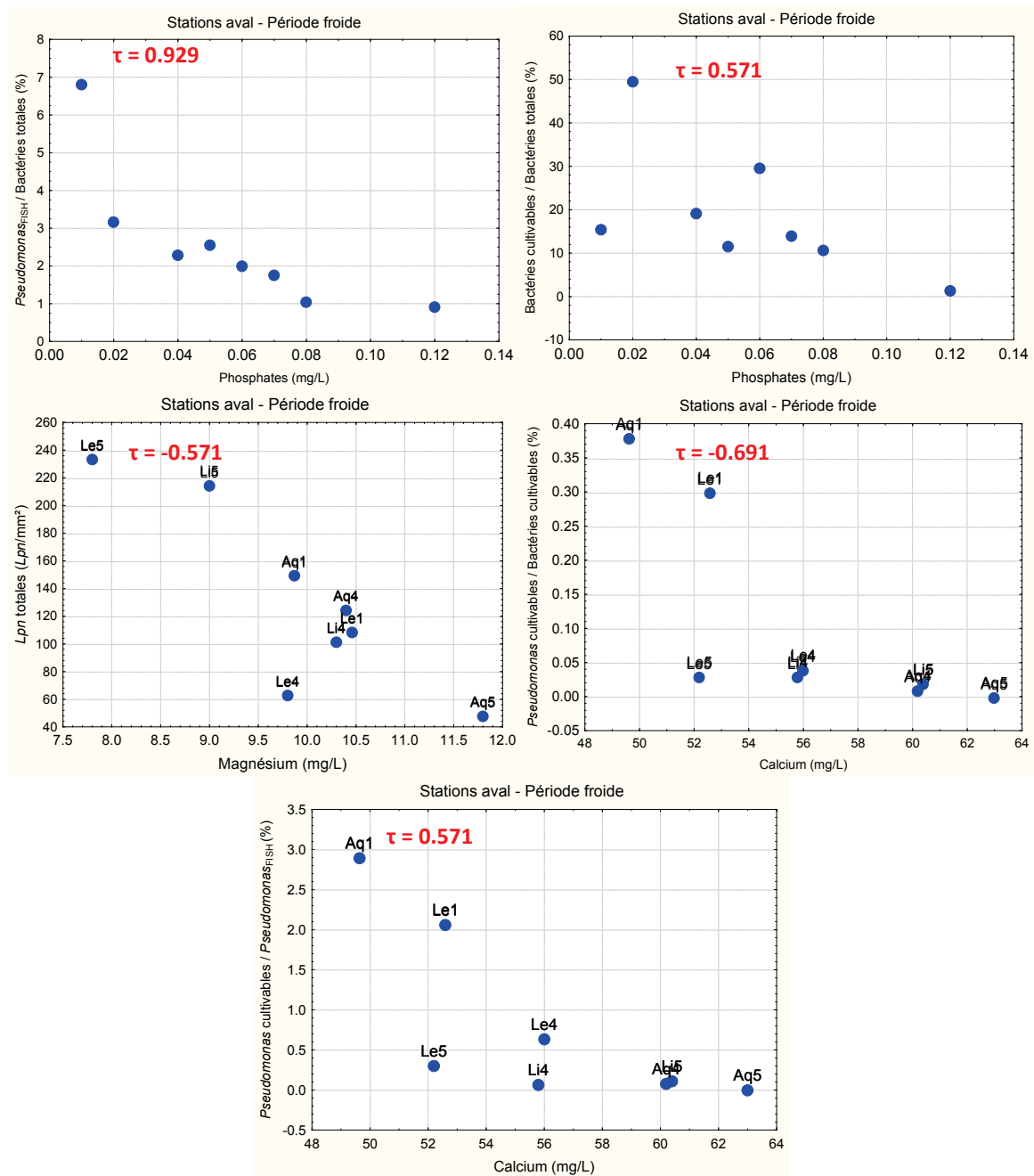


Figure 148 : Relation entre les concentrations des principales espèces ioniques et les descripteurs du biofilm (n=8). Le τ est le coefficient de corrélation de Kendall, il est en rouge lorsqu'il est significatif ($p \leq 0.05$).

Codes des stations : Li : Liège ; Le : Lepic ; Aq : Aquarium ;

Codes des campagnes : 1 : Décembre 07 ; 4 : Décembre 08 ; 5 : mars 09.

Contrairement aux deux précédents groupes de données ("groupe Mirabeau" et "groupe Parking") dans lesquels peu de descripteurs biologiques étaient corrélés entre eux, avec ce troisième groupe on observe des comportements intéressants entre certains descripteurs biologiques. C'est le cas des corrélations négatives qui apparaissent entre les concentrations de Lpn_{totales} ou de $Lpn_{\text{cultivables}}$, d'une part et les bactéries du groupe "*Pseudomonas*_{FISH} et bactéries apparentées" (Figure 149). L'existence de telles corrélations suggère l'établissement, en période hivernale, d'un antagonisme entre les bactéries de ce groupe et les différents états de *Lpn*. S'il s'agit bien d'un antagonisme et si cet antagonisme fait intervenir une bactériocine, nos résultats montrent, d'une part, que *Pseudomonas* et les bactéries qui lui sont apparentées sont capables de produire cette toxine, même lorsqu'elles sont dans un état non cultivable, et, d'autre part, que cette toxine a une action sur les différents états physiologiques de *Lpn*.

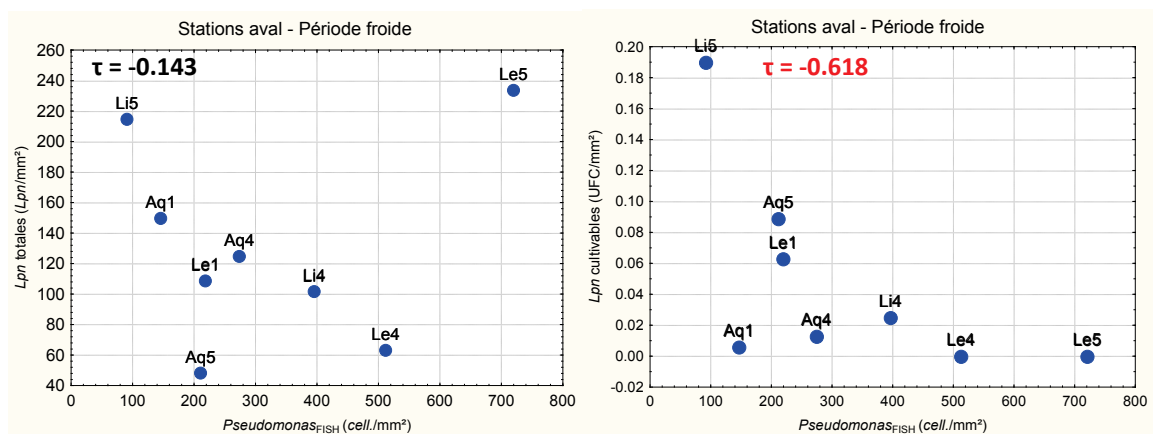


Figure 149 : Relation entre les concentrations des différents états physiologiques de *Lpn* et la concentration de "*Pseudomonas*_{FISH} et des bactéries apparentées" (n=8). Le τ est le coefficient de corrélation de Kendall, il est en rouge lorsqu'il est significatif ($p \leq 0.05$).

Codes des stations : Li : Liège ; Le : Lepic ; Aq : Aquarium ;

Codes des campagnes : 1 : Décembre 07 ; 4 : Décembre 08 ; 5 : mars 09.

Les concentrations de $Lpn_{\text{cultivables}}$ sont négativement corrélées à la concentration en matière organique. A l'inverse, la concentration en matière organique est positivement corrélée à la concentration de bactéries_{cultivables}, et plus particulièrement à celle des bactéries du groupe "*Pseudomonas* et bactéries apparentées" (Figure 150). Il est donc possible que l'antagonisme évoqué plus haut soit apparent et que les résultats s'expliquent plutôt par les réponses différentes des ces deux groupes aux conditions environnementales. Il est également possible qu'en raison de ses exigences et de sa croissance lente, la forme cultivable de *Lpn* soit moins compétitive face aux espèces à croissance rapide telles que *Pseudomonas* lorsque la communauté bactérienne cultivable est importante dans le biofilm.

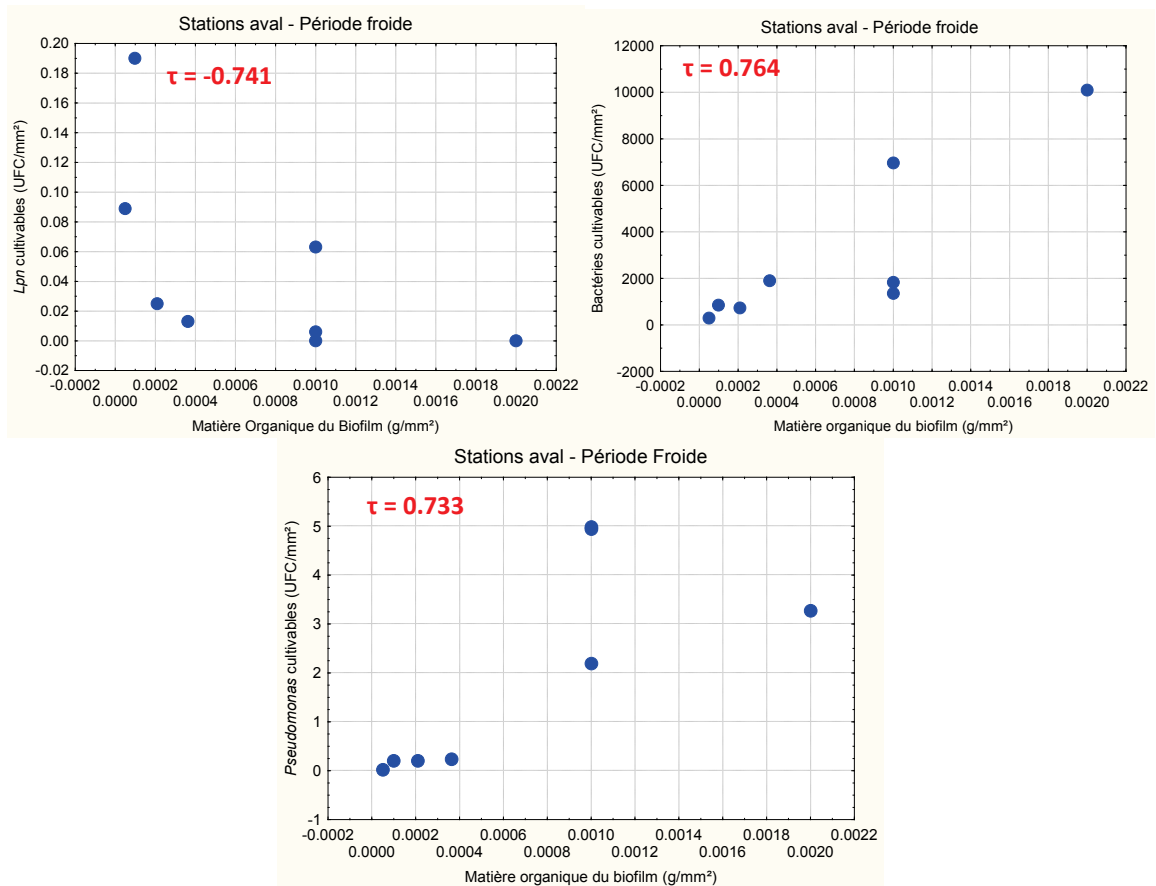


Figure 150 : Relation entre la concentration de matière organique du biofilm et les concentrations de bactéries_{cultivables} de *Lpn*_{cultivables} et des bactéries du groupe "*Pseudomonas*_{cultivables} et bactéries apparentées" (n=8). Le τ est le coefficient de corrélation de Kendall, il est en rouge lorsqu'il est significatif ($p \leq 0.05$).

La concentration de *Lpn*_{cultivables} est également corrélée négativement avec la concentration de protistes et plus spécifiquement d'amibes (Figure 151). Ces corrélations vont dans le sens de l'hypothèse d'un développement intra-cellulaire de *Lpn* dans les amibes ainsi que dans d'autres espèces de protistes conduisant à l'éclatement de celles-ci et à la libération de *Lpn*_{cultivables}.

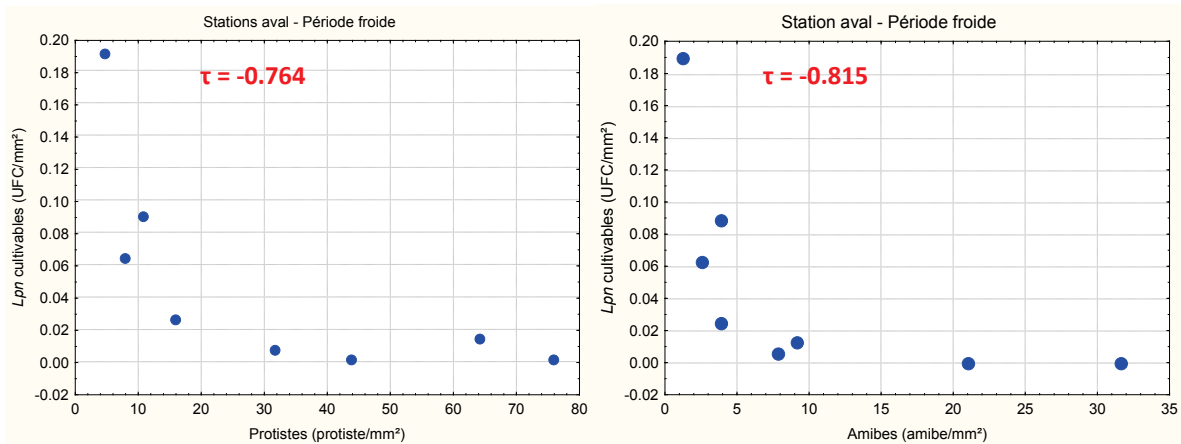


Figure 151 : Relation entre les concentrations de *Lpn*_{cultivables} et les concentrations de protistes et plus particulièrement des amibes (n=8). Le τ est le coefficient de corrélation de Kendall, il est en rouge lorsqu'il est significatif ($p \leq 0.05$).

En conclusion, les paragraphes précédents montrent que les caractéristiques de ce groupe de stations durant les périodes froides (décembre 07/08, mars 09), se distinguent de celles des deux groupes précédents (correspondant, rappelons-le, aux deux stations situées plus en amont). En effet, les descripteurs physico-chimiques y ont un rôle moins important sur la structure biologique des biofilms, sauf dans le cas particulier des différentes formes des bactéries du groupe "*Pseudomonas* et bactéries apparentées". Nous avons également mis en évidence un antagonisme apparent entre les bactéries de ce groupe et *Lpn*, quel que soit l'état physiologique considéré. Cette observation doit cependant être considérée avec prudence et a fortiori la recherche d'une interprétation, en raison des incertitudes sur l'identité des bactéries qui ont été attachées à ce groupe. S'il est avéré, ce résultat peut être l'aboutissement de processus d'antibiose mais tout aussi d'une réponse opposée des deux groupes aux conditions dans lesquelles se développe le biofilm.

6.2.2.4 Groupe des stations situées à l'aval de l'ensemble des arrivées d'eaux thermales en période chaude

Le dernier groupe de données est constituées par les trois stations aval (Liège, Lepic et Aquarium) considérées durant les campagnes estivales (juin 2008, septembre 2008 et juin 2009).

L'augmentation du débit médian lors de la période d'incubation a tendance à être associée à une baisse de la concentration des phosphates (Figure 152). Il est donc possible que les apports de phosphates proviennent principalement de rejets dans le réseau (eaux usées par exemple), qui sont alors dilués lors des augmentations de débits. Cette hypothèse s'appuie également sur une légère augmentation de la concentration des phosphates depuis l'amont vers l'aval du réseau, ainsi que sur la présence de déchets flottant dans le cours d'eau observée lors de certains prélèvements.

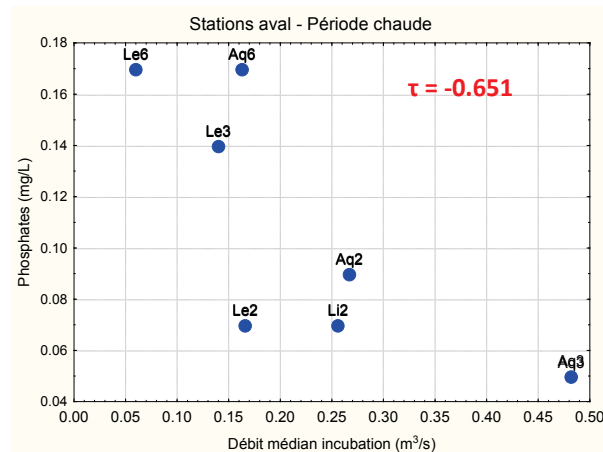


Figure 152 : Relation entre le débit médian de la période d'incubation et la concentration des ions phosphates (n=7). Le τ est le coefficient de corrélation de Kendall, il est en rouge lorsqu'il est significatif ($p \leq 0.05$).

Codes des stations : Li: Liège, Le: Lepic; Aq: Aquarium;
Codes des campagnes 2: Juin 08; 3: Septembre 08; 6: Juin 09.

L'augmentation du débit médian pendant la période de pré-incubation peut être associée à une baisse de la concentration des bactéries_{totales} (Figure 153). À l'image des concentrations en phosphates, les augmentations de débits appauvrissent le cours d'eau en nutriments (par effet de dilution) et conduisent alors à un moins bon développement des bactéries_{totales}. Il est également possible que ce soit l'augmentation des forces de cisaillement consécutive à ces augmentations de débit qui limite le développement bactérien.

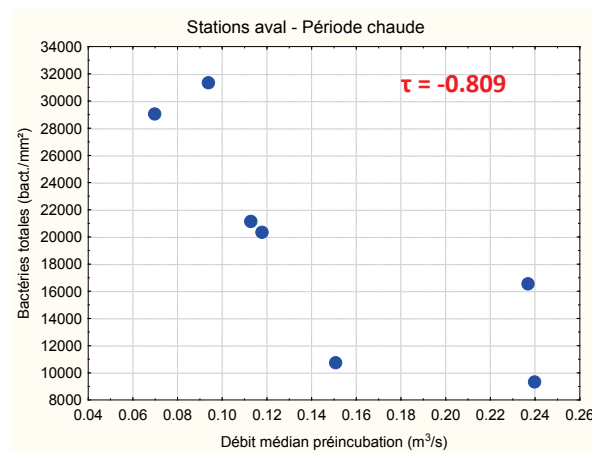


Figure 153 : Influence du débit de la période de pré-incubation sur les concentrations de bactéries_{totales} (n=7). Le τ est le coefficient de corrélation de Kendall, il est en rouge lorsqu'il est significatif ($p \leq 0.05$).

Au cours de l'ensemble des prélèvements correspondant à ce groupe de données, seules deux augmentations de débit sont considérées comme significatives. Il n'est donc pas possible d'utiliser ce paramètre dans la recherche de corrélations. Une tendance est tout de même visible, car les biofilms dont les poids secs sont les plus élevés sont issus de ces deux prélèvements. Une augmentation de la charge des particules en suspension du cours d'eau et leur sédimentation lors du passage ralenti de l'eau dans les tubes supports des substrats artificiels permettent d'expliquer ce phénomène.

Même considéré à travers son ordre de grandeur, le facteur vitesse de l'eau apparaît ici particulièrement déterminant pour les caractéristiques des biofilms. La station Liège, au niveau de laquelle la vitesse est la plus importante, présente une eau peu chargée en COD et des biofilms où une faible proportion de matières organiques est associée à une forte proportion de *Lpn* sous forme cultivables ou non. La vitesse pourrait ne pas être le seul facteur explicatif de ces proportions supérieures de *Lpn*, sachant que cette station se situe à proximité des rejets contaminés des eaux thermales.

Dans ce groupe de données, l'analyse de la température médiane donne les mêmes résultats que l'analyse basée sur les degrés jour. Contrairement aux observations faites pour les périodes froides, les concentrations de *Lpn*_{cultivables} et de *Lpn*_{totales} augmentent avec la température durant les périodes chaudes (Figure 154). A l'exception d'un point, cette remarque concerne également le rapport *Lpn*_{cultivables} / *Lpn*_{totales}, montrant un effet plus important de la température de l'eau sur la forme cultivable que sur l'ensemble des *Lpn*. L'augmentation de la température correspond également à une augmentation de la concentration en matière organique du biofilm (Figure 154).

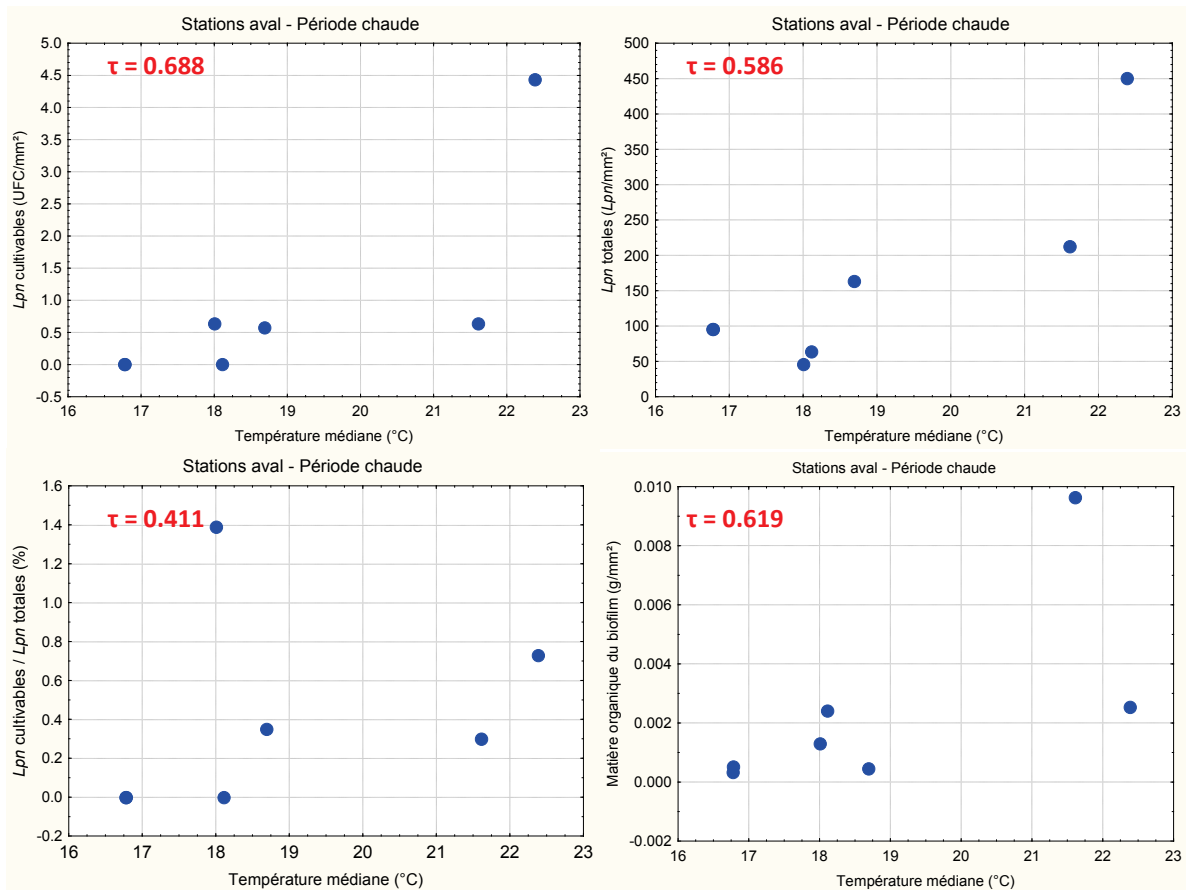


Figure 154 : Relation entre la température et la présence de *Lpn* sous ses différents états physiologiques et entre la température et la concentration de matière organique du biofilm (n=7). Le τ est le coefficient de corrélation de Kendall, il est en rouge lorsqu'il est significatif (p≤0.05).

Les protistes sont moins présents dans les biofilms qui se développent dans les eaux les plus chaudes (Figure 155). Cette baisse est principalement corrélée à la baisse des flagellés. Le rapport entre la concentration des bactéries_{totales} et celle des amibes diminue également lorsque la température augmente, principalement en raison de l'augmentation des concentrations d'amibes. L'augmentation de la concentration en matière organique du biofilm, elle-même corrélée à la température, est donc logiquement corrélée à la concentration des amibes sans pour autant que cela soit le seul facteur explicatif.

Les conditions estivales permettent peut-être également aux amibes d'être plus actives, ou d'être moins fréquemment enkystées. Leur pression de prédation est alors plus forte et va dans le sens de la diminution de la concentration des bactéries totales (Figure 155). Il est également possible qu'en cas de développement intra-cellulaire de *Lpn*, le taux d'éclatement des amibes soit inférieur au taux de multiplication des amibes non infectées, ce qui expliquerait l'évolution parallèle entre les amibes et *Lpn*.

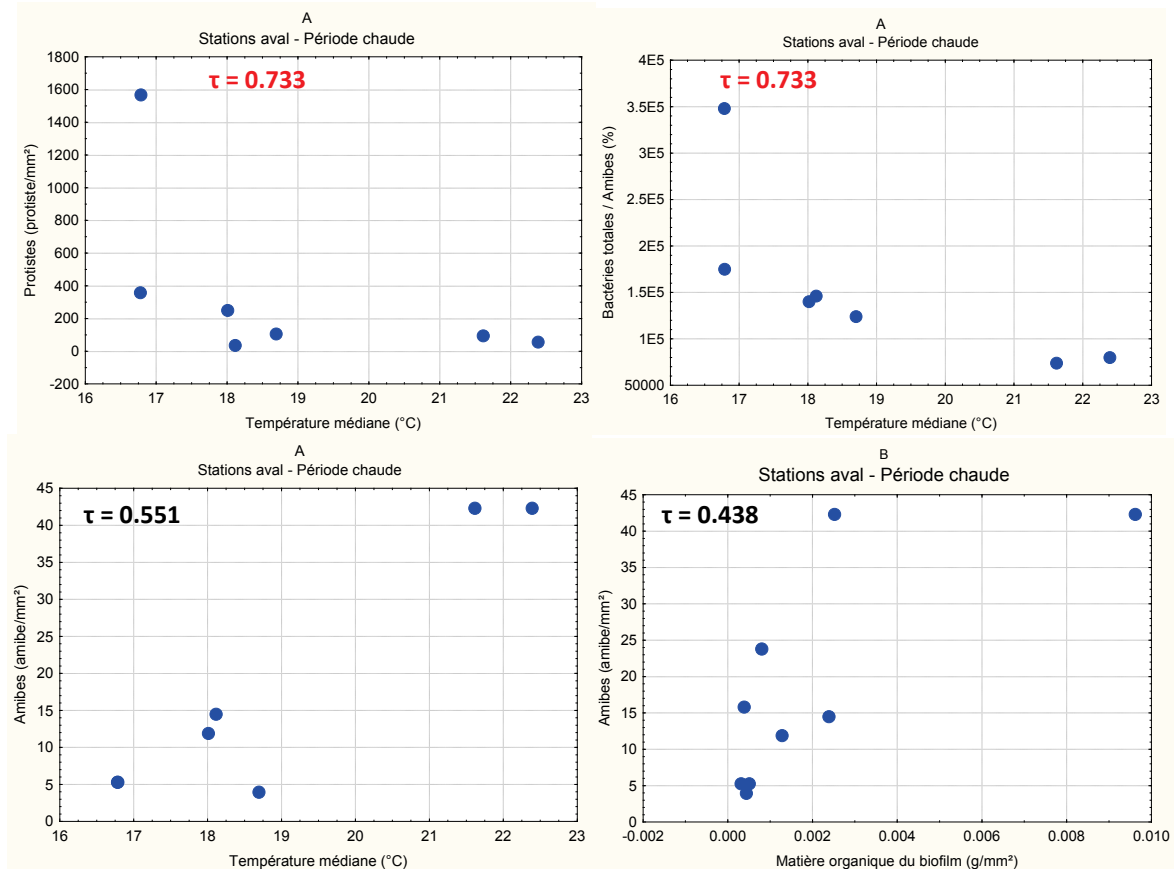


Figure 155 : A : Relation entre la température d'une part, et d'autre part la concentration des protistes, des amibes et du rapport bactéries_{totales} / amibes. B : Relation entre la concentration des amibes et celle des matières organiques du biofilm (n=7). Le τ est le coefficient de corrélation de Kendall, il est en rouge lorsqu'il est significatif ($p \leq 0.05$).

Il est à noter enfin, qu'une élévation de la température est associée à une augmentation de la concentration des ions sulfates et sodium (Figure 156). Cette évolution des sulfates peut être le résultat de la combinaison d'un certain degré étiage du cours d'eau et d'une forte activité de l'établissement thermal.

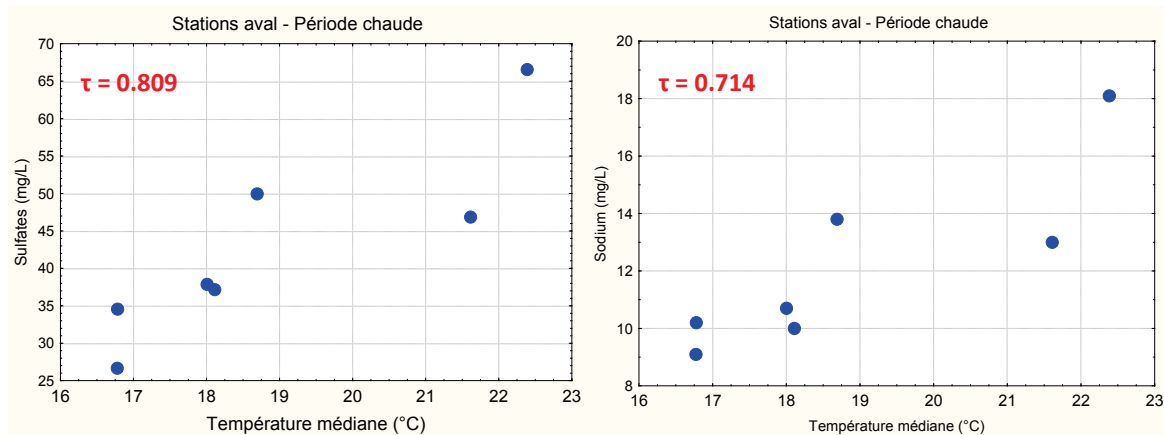


Figure 156 : Relation entre la température et les concentrations des ions sulfates et sodium (n=7). Le τ est le coefficient de corrélation de Kendall, il est en rouge lorsqu'il est significatif ($p \leq 0.05$).

La concentration en COD de l'eau est négativement corrélée à sa concentration en magnésium indiquant que le COD provient essentiellement du bassin versant à l'inverse du magnésium qui provient principalement des apports d'eaux thermales (Figure 157). La concentration du COD est importante pour le développement général du biofilm. En effet, elle varie dans le même sens que la concentration des bactéries_{totales} et des bactéries_{cultivables}. Par contre, elle varie à l'inverse des rapports $Lpn_{\text{totales}} / \text{bactéries}_{\text{totales}}$ et $Lpn_{\text{cultivables}} / \text{bactéries}_{\text{cultivables}}$. De ce fait, la concentration de $Lpn_{\text{cultivables}}$ diminue avec la concentration en COD.

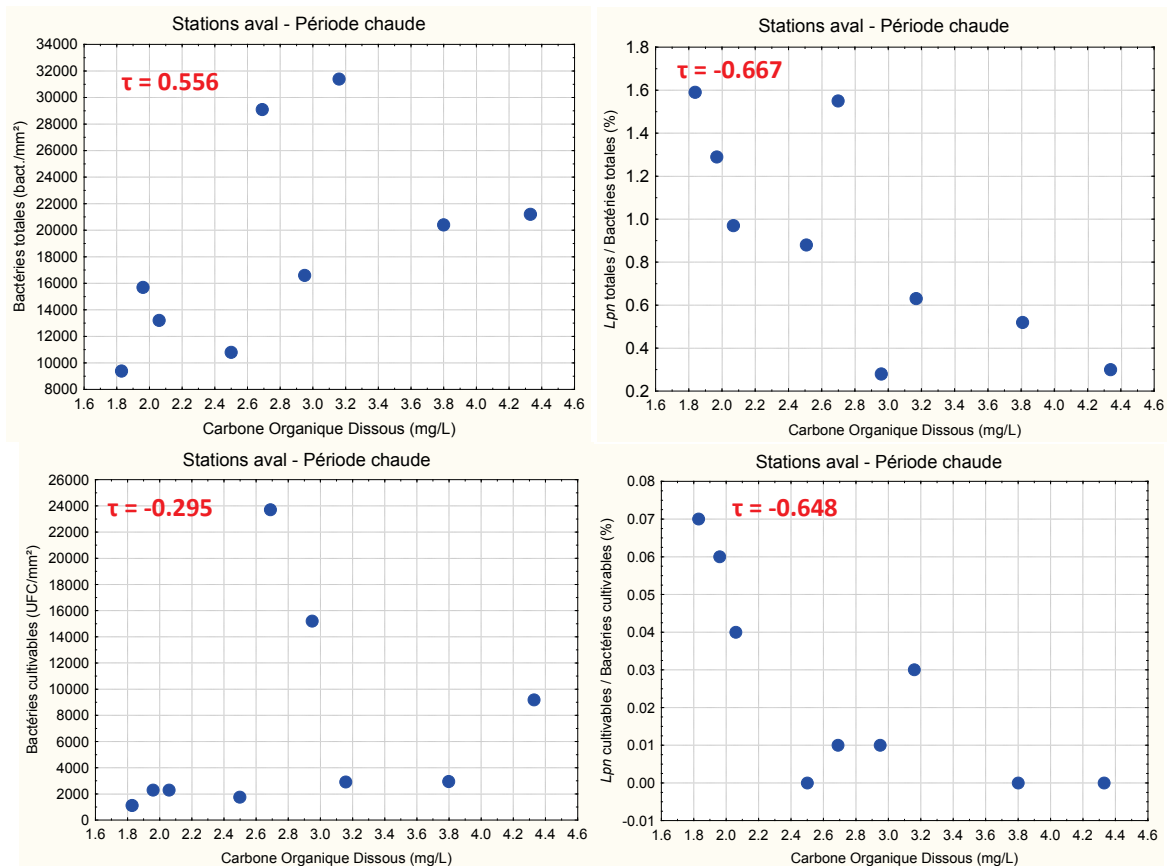


Figure 157 : Relation entre la concentration de COD et les concentrations bactériennes (n=9). Le τ est le coefficient de corrélation de Kendall, il est en rouge lorsqu'il est significatif ($p \leq 0.05$).

En période estivale, les espèces ioniques les plus fortement corrélées aux changements de conductivité sont le sodium, les chlorures et le calcium (Figure 158). Comme précédemment, l'apport de chlorures et de sodium se fait principalement sous la forme de NaCl. L'augmentation de la conductivité est associée, à la fois, à une augmentation de la concentration de $Lpn_{cultivables}$ et à la baisse de la concentration des bactéries du groupe "*Pseudomonas*_{FISH} et bactéries apparentées". Les rapports des bactéries cultivables aux "bactéries FISH" de ce groupe, de $Lpn_{cultivables} / Lpn_{totales}$ et de $Lpn_{cultivables} / \text{amibes}$ sont également corrélés positivement à la conductivité.

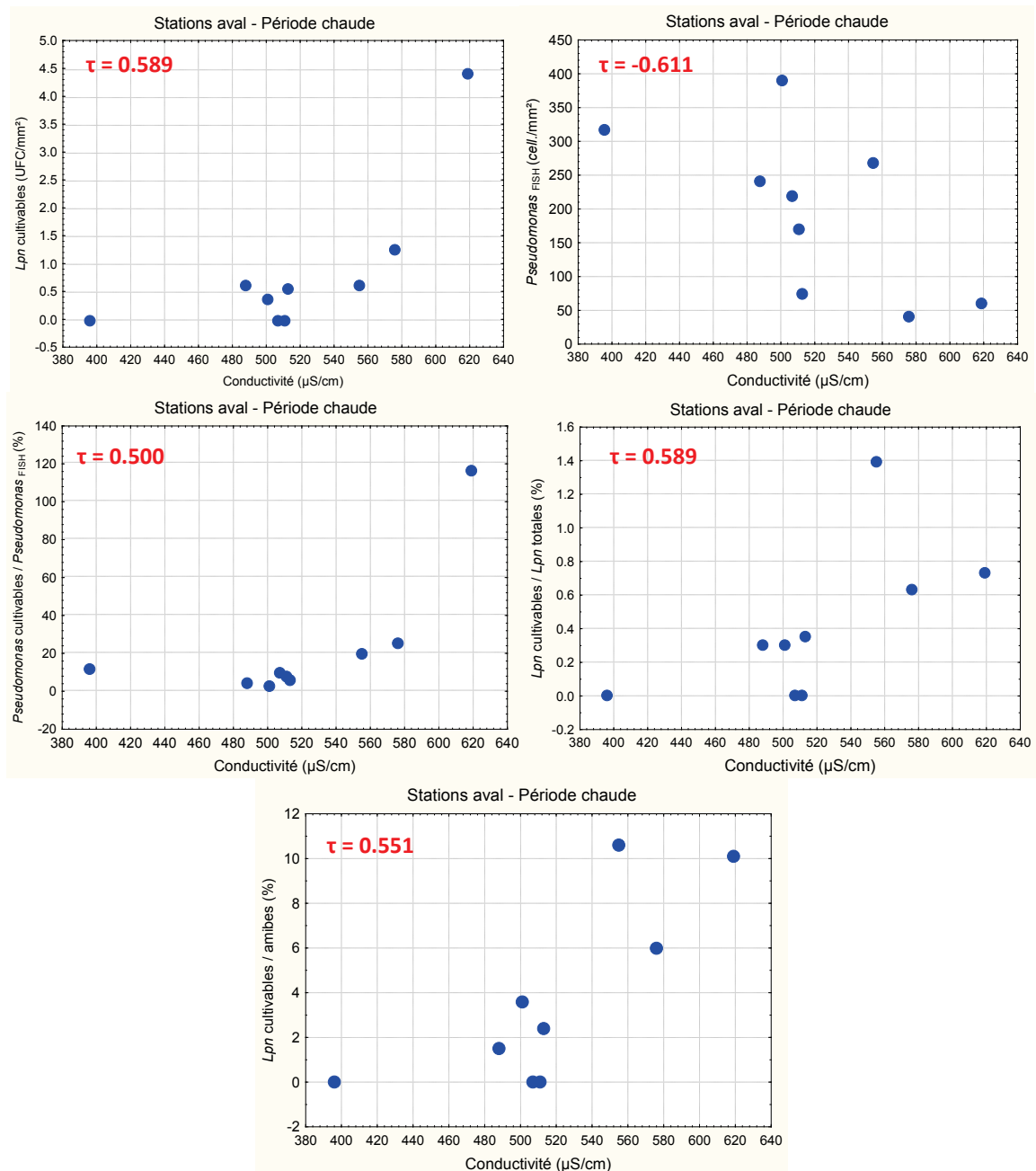


Figure 158 : Relation entre la conductivité d'une part, et d'autre part le développement de $Lpn_{cultivables}$, des bactéries du groupe "*Pseudomonas* et bactéries apparentées" ainsi que de la proportion de ces deux groupes bactériens (n=9). Le τ est le coefficient de corrélation de Kendall, il est en rouge lorsqu'il est significatif ($p \leq 0.05$).

Les espèces ioniques considérées sont corrélées à différents descripteurs de la communauté bactérienne (bactéries_{totales}, *Lpn* et groupe "*Pseudomonas* et bactéries apparentées") ou des protistes. La concentration des bactéries_{totales} est corrélée positivement avec les concentrations de phosphates. Cet ion joue probablement un rôle nutritif direct et/ou indirect vis-à-vis de la communauté bactérienne (via l'activité photosynthétique des diatomées, par exemple, dans les parties aériennes du réseau). La concentration de l'ion potassium est également positivement corrélée à la concentration des bactéries_{totales}, même si la corrélation est moins forte que celle impliquant les ions phosphates. La concentration des ions potassium varie également dans le même sens que la concentration des bactéries_{cultivables} et plus spécifiquement des bactéries du groupe "*Pseudomonas*_{cultivables} et bactéries apparentées". Cette remarque s'applique à une gamme de concentration en potassium supérieure à 1.5 mg/L (Figure 159).

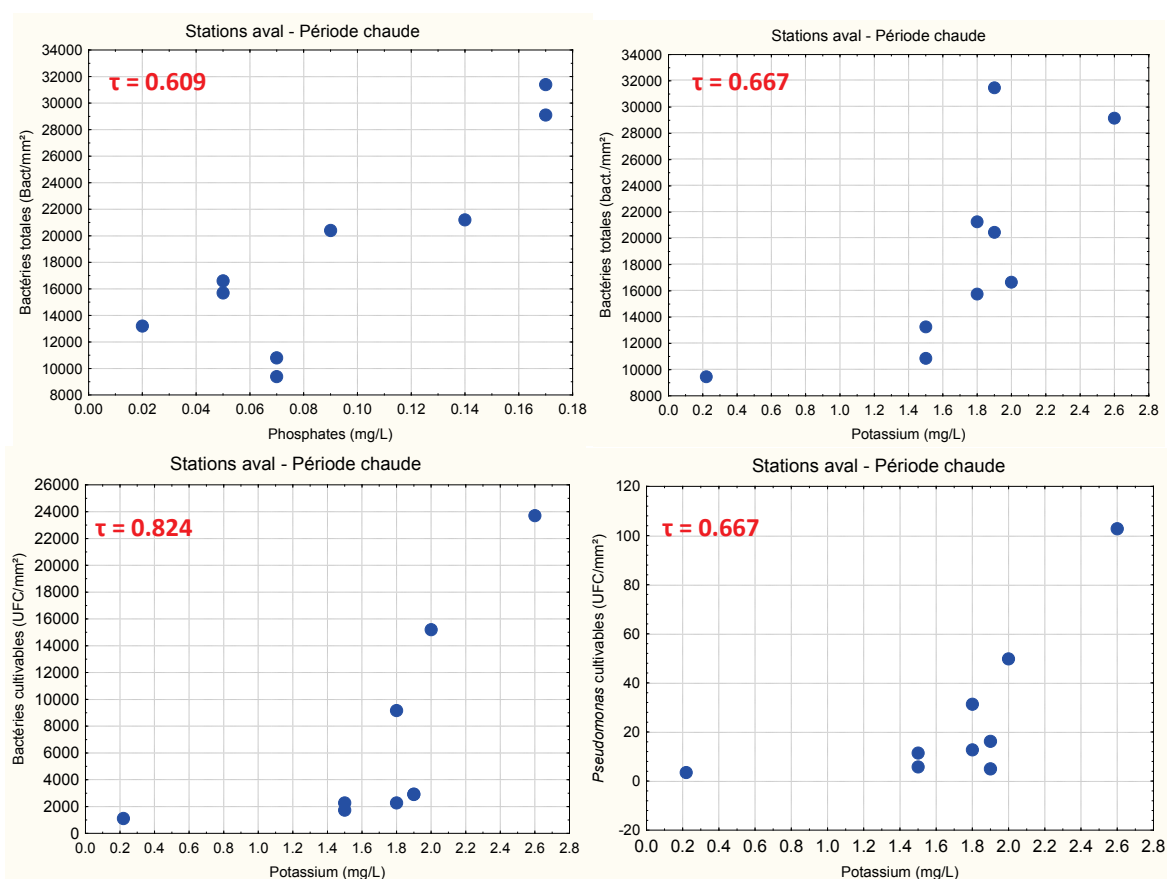


Figure 159 : Relation entre plusieurs descripteurs du développement bactérien du biofilm et les concentrations des ions phosphates et potassium (n=9). Le τ est le coefficient de corrélation de Kendall, il est en rouge lorsqu'il est significatif ($p \leq 0.05$).

Les protistes sont les seuls organismes du biofilm dont les variations de concentration semblent suivre celles des ions nitrates, mais exclusivement dans une gamme de concentration supérieure à 4.5 mg/L (Figure 160).

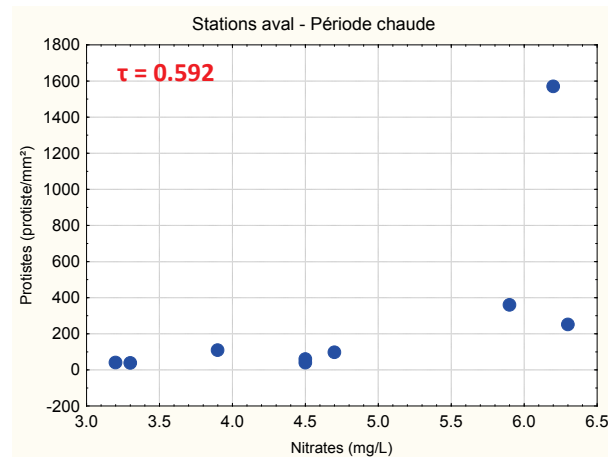


Figure 160 : Relation entre les concentrations des ions nitrates et celles des protistes (n=9). Le τ est le coefficient de corrélation de Kendall, il est en rouge lorsqu'il est significatif ($p \leq 0.05$).

La concentration de l'ion calcium est corrélée positivement aux rapports $Lpn_{\text{totales}} / \text{amibes}$, et "*Pseudomonas*_{cultivables} et bactéries apparentées" / bactéries_{cultivables} (Figure 161).

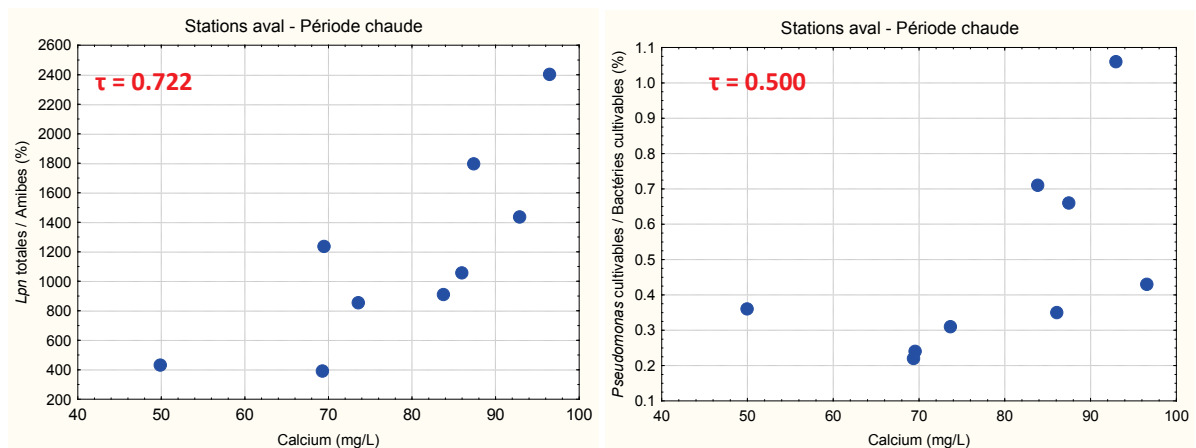


Figure 161 : Relations entre la concentration des ions calcium et les rapports $Lpn_{\text{totales}} / \text{amibes}$ et "*Pseudomonas*_{cultivables} et bactéries apparentées" / bactéries_{cultivables} (n=9). Le τ est le coefficient de corrélation de Kendall, il est en rouge lorsqu'il est significatif ($p \leq 0.05$).

Les sulfates dont l'origine thermique a été discutée précédemment varient dans le même sens que la température de l'eau, et à l'inverse du rapport "*Pseudomonas*_{cultivables} et bactéries apparentées" / bactéries_{cultivables} (Figure 162). Il est donc possible que la proportion de bactéries du groupe "*Pseudomonas*_{cultivables} et bactéries apparentées" soit moins importante dans les eaux thermales que dans les eaux du Tillet.

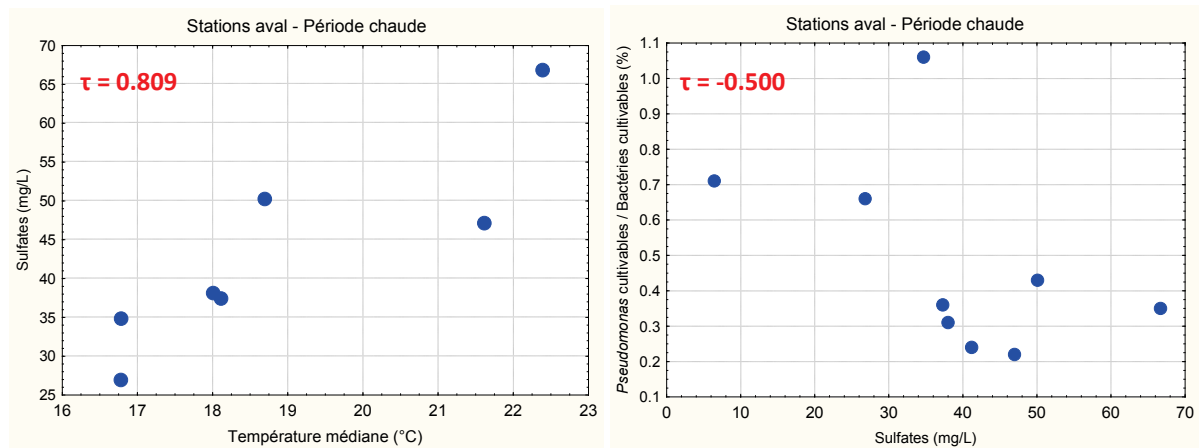


Figure 162 : Relations entre la concentration en sulfates d'une part, et d'autre part la température médiane (de la période d'incubation) et la proportion de bactéries du groupe "*Pseudomonas*_{cultivables} et bactéries apparentées" (par rapport aux bactéries_{cultivables} ; n=8 à 9). Le τ est le coefficient de corrélation de Kendall, il est en rouge lorsqu'il est significatif ($p \leq 0.05$).

Les concentrations de *Lpn* sont corrélées à différentes espèces ioniques. La concentration de l'ion magnésium, tout d'abord, elle-même corrélée positivement à celle de l'ion sodium et négativement à la concentration de COD, varie dans le même sens que les concentrations de *Lpn*_{cultivables} et de *Lpn*_{totales} (Figure 163).

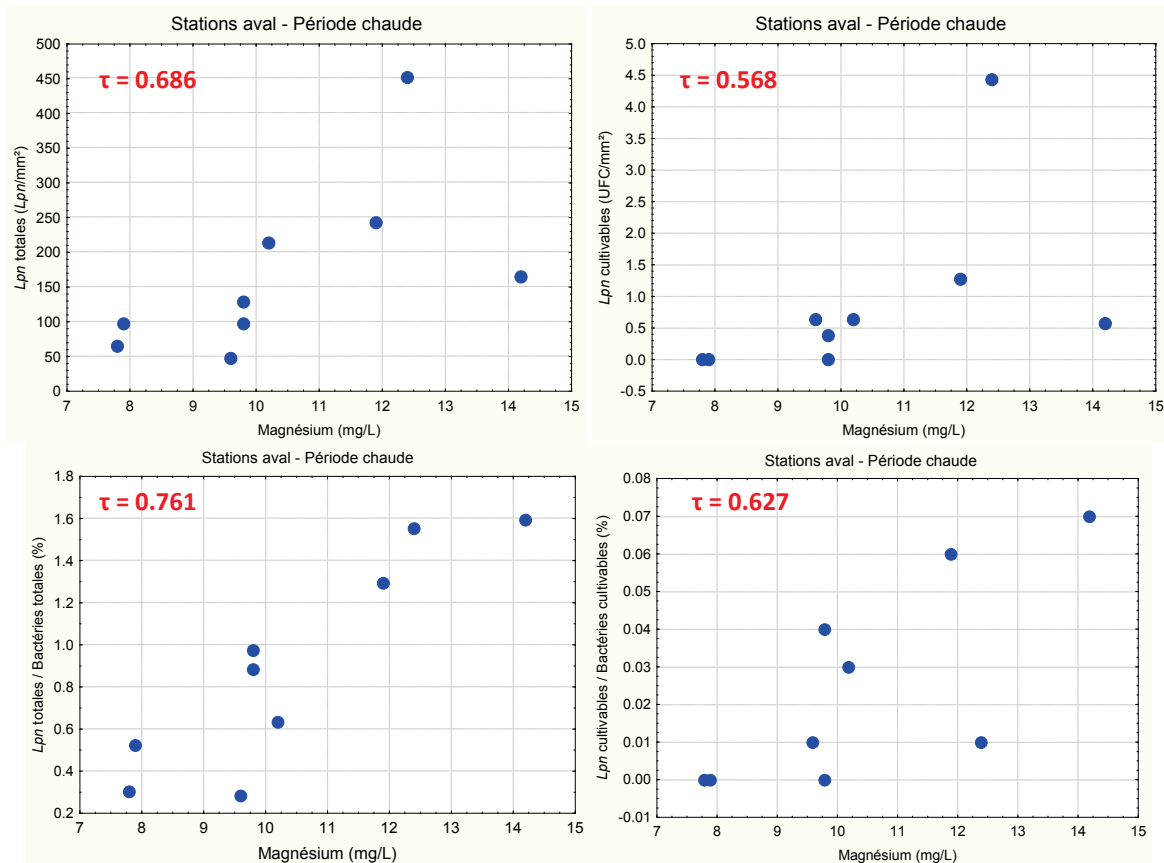


Figure 163 : Relation entre les concentrations de l'ion magnésium et les différents descripteurs de *Lpn* (n=9). Le τ est le coefficient de corrélation de Kendall, il est en rouge lorsqu'il est significatif ($p \leq 0.05$).

La concentration de *Lpn*_{cultivables} est également corrélée à la concentration des ions chlorures, qui est elle-même corrélée positivement à la concentration de la matière organique du biofilm (Figure 164). Comme la concentration de *Lpn* celle des bactéries du groupe "*Pseudomonas*_{cultivables} et bactéries apparentées" augmente simultanément à l'augmentation de la concentration des ions chlorures, mais uniquement à partir d'une concentration de chlorures de 14 ppm. A l'inverse, le rapport "*Pseudomonas*_{FISH} et bactéries apparentées"/bactéries_{totales} suit une évolution opposée à celle de la concentration des chlorures.

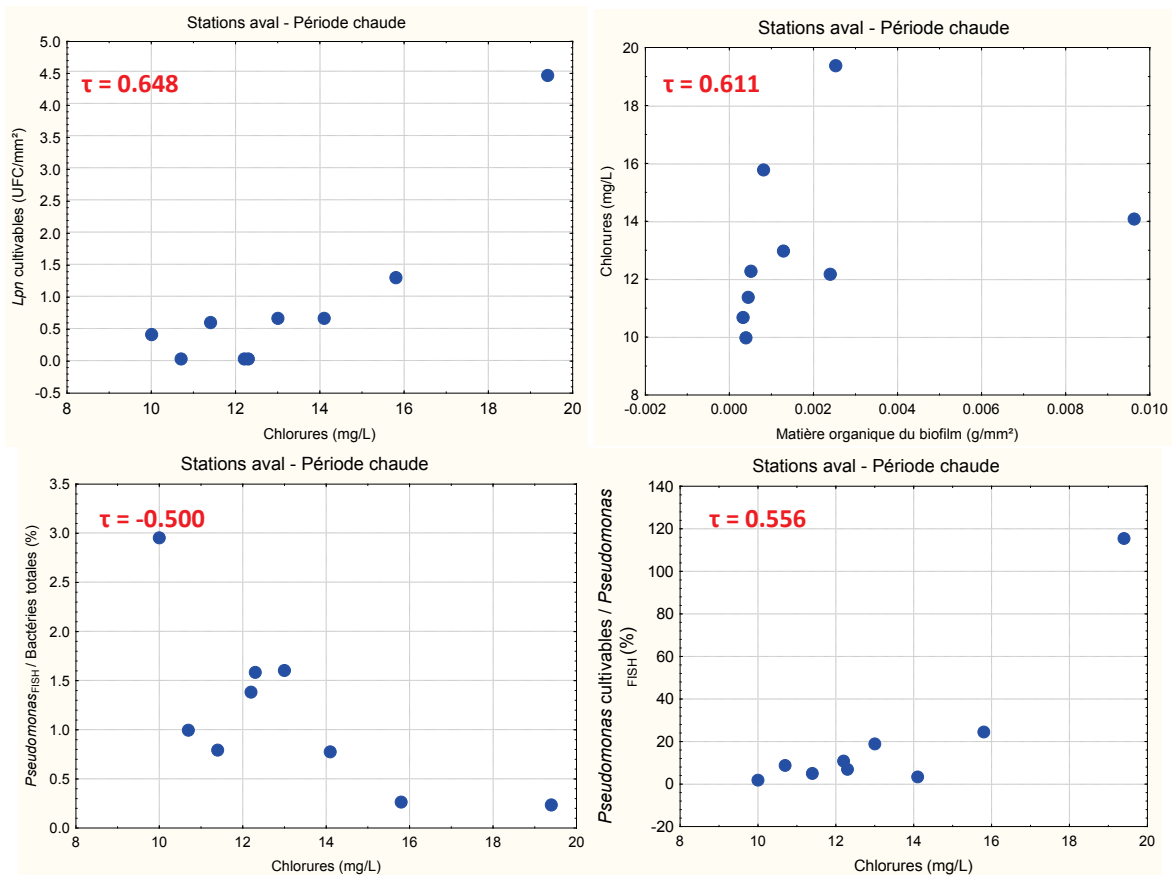


Figure 164 : Influence des ions chlorures sur le développement du biofilm (n=9). Le τ est le coefficient de corrélation de Kendall, il est en rouge lorsqu'il est significatif ($p \leq 0.05$).

L'évolution de l'ion sodium est en relation avec celles d'un grand nombre de descripteurs biologiques. Il varie dans le même sens que les concentrations de Lpn quel que soit l'état physiologique considéré, et dans le sens inverse des concentrations des bactéries du groupe " $Pseudomonas_{FISH}$ et bactéries apparentées" (Figure 165). Il intervient également dans l'évolution des rapports impliquant ces descripteurs biologiques : ainsi la corrélation est positive avec les rapports suivants :

- $Lpn_{cultivables} / Lpn_{totales}$
- $Lpn_{cultivables} / amibes$
- $Lpn_{cultivables} / bactéries_{cultivables}$

L'influence de cet ion sur les rapports précédents est liée à ses relations avec la concentration de $Lpn_{cultivables}$ (Figure 165). La concentration de cet ion est également négativement corrélée aux rapports flagellés / bactéries_{totales} et bactéries_{totales} / amibes.

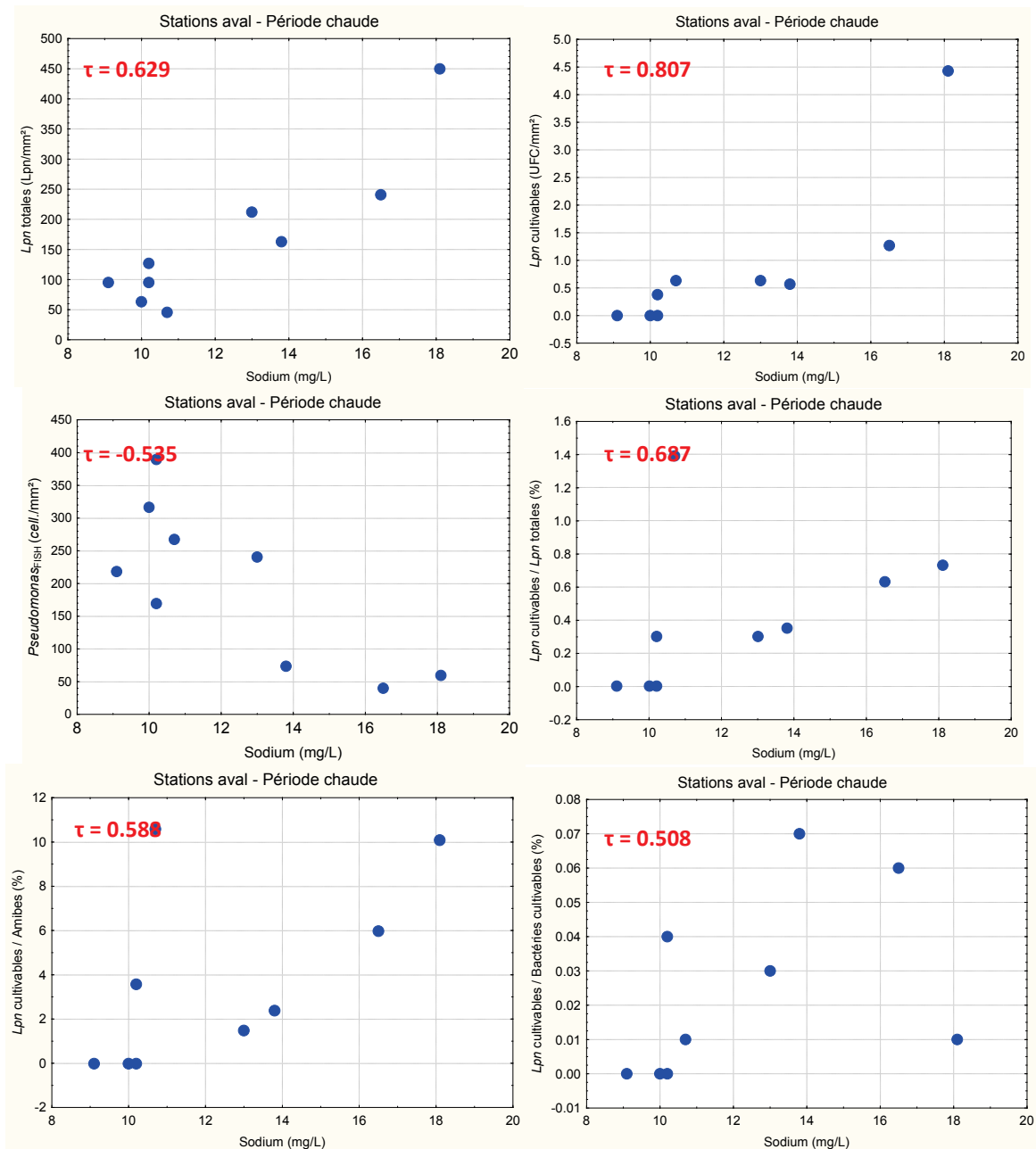


Figure 165 : Relations entre la concentration des ions sodium et le développement des biofilms, notamment avec la concentration de *Lpn* sous ses différents états physiologiques (n=9). Le τ est le coefficient de corrélation de Kendall, il est en rouge lorsqu'il est significatif ($p \leq 0.05$).

L'étude des corrélations entre les descripteurs biologiques met en évidence une opposition entre l'évolution des concentrations de deux groupes de protistes : les amibes et les flagellés (Figure 166). Cette opposition peut s'expliquer à travers la différence de leur mode de vie. En effet, les amibes vivent et se nourrissent au sein même du biofilm, tandis que les flagellés peuvent se nourrir dans la colonne d'eau et non pas dans le biofilm lui-même (Parry, 2004). De plus, les variations des concentrations de protistes sont en fait principalement celles des flagellés qui en constituent le plus gros effectif.

On remarque également des corrélations positives entre les concentrations de bactéries_{totales} et de bactéries_{cultivables}, ainsi qu'entre les concentrations des bactéries du groupe "*Pseudomonas*_{cultivables} et bactéries apparentées" et celles des bactéries_{cultivables} (Figure 166). A l'opposé, aucune des formes considérées de *Lpn* ne présente de corrélation avec les concentrations de bactéries_{totales} et de bactéries_{cultivables}. On retrouve ici l'existence d'un probable antagonisme entre le développement de *Lpn*_{totales} et les bactéries du groupe "*Pseudomonas*_{FISH} et bactéries apparentées", cette tendance étant apparemment restreinte à une concentration des bactéries du groupe inférieure à 270 cellules/mm² (Figure 166). Lorsque les conditions sont très favorables à ces bactéries, il semble donc que les processus par lesquels elles limitent le développement de *Lpn* soient au moins partiellement levés.

La concentration de *Lpn* est corrélée positivement à la concentration en amibes (Figure 166): plusieurs hypothèses permettent d'expliquer cette corrélation. La première hypothèse repose sur une multiplication amibienne intense qui masque les pertes dues à l'éclatement des amibes permettant la multiplication intra-cellulaire de *Lpn*. La seconde hypothèse repose sur une multiplication de *Lpn*_{cultivables} dans le biofilm sans nécessité d'une multiplication intra-cellulaire.

Notons également la présence d'une corrélation négative entre les rapports *Lpn*_{cultivables} / bactéries_{cultivables} et bactéries_{totales} / amibes. Lorsque la fréquence de *Lpn*_{cultivables} est petite, un plus grand nombre de bactéries est à la disposition de chacune des amibes. En d'autres termes, la concentration en amibe serait relativement petite vis-à-vis de la concentration des bactéries ce qui laisse supposer qu'une partie d'entre elles disparaisse suite à la multiplication intra-cellulaire de *Lpn*. Cette influence est difficilement envisageable dans un contexte où la fréquence de *Lpn*_{cultivables} est petite. On peut voir dans ce constat une confirmation de la seconde hypothèse évoquée plus haut, mais il est plus probable qu'il faut y voir une manifestation de la complexité du fonctionnement des communautés microbiennes dans les biofilms et des difficultés que nous avons encore à l'appréhender.

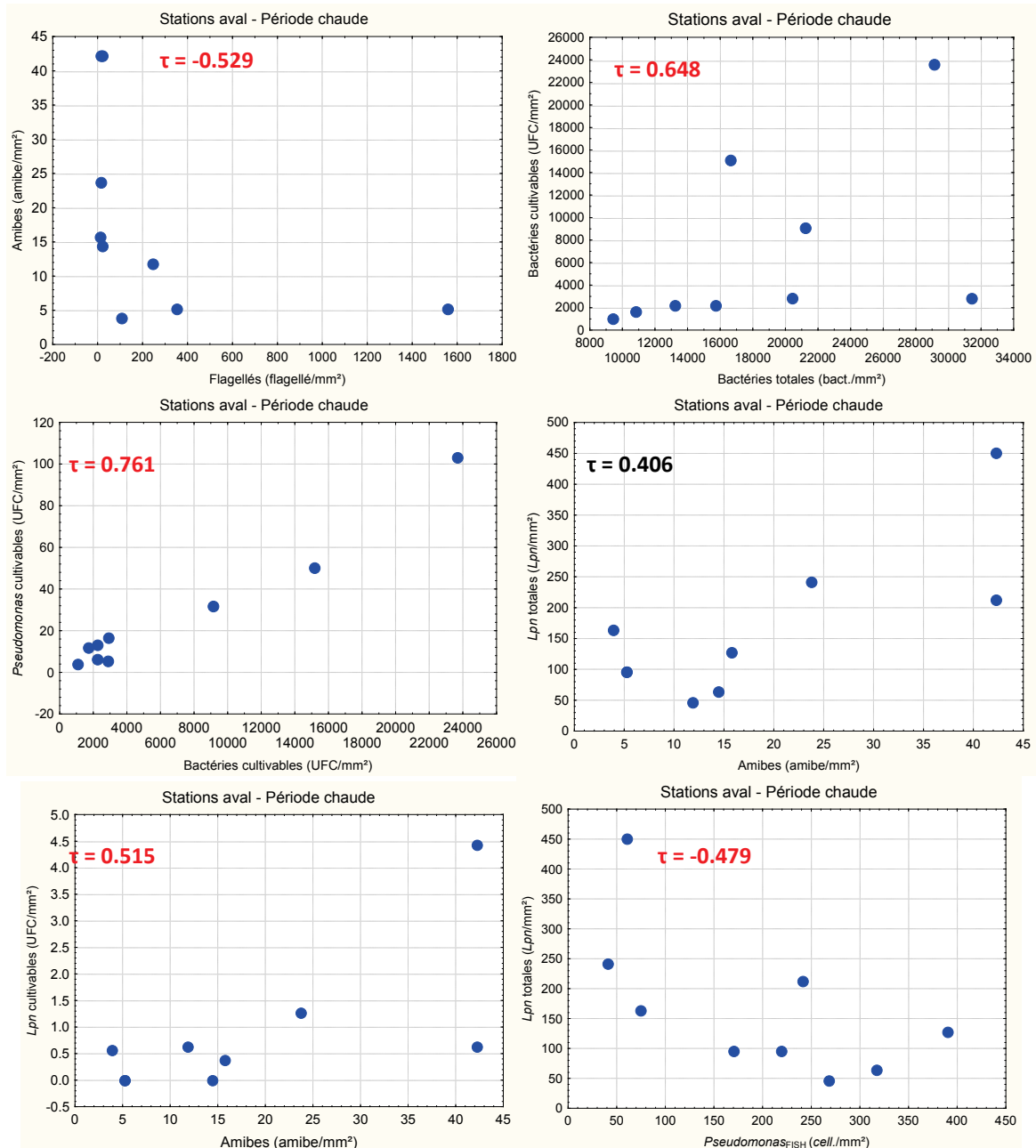


Figure 166 : Corrélations entre les descripteurs biologiques des biofilms (n=9). Le τ est le coefficient de corrélation de Kendall, il est en rouge lorsqu'il est significatif ($p \leq 0.05$).

En conclusion, durant les périodes chaudes, le développement des biofilms dans ces trois stations dépend de paramètres physico-chimiques particuliers dont l'action ne se limite plus seulement à *Pseudomonas* et aux bactéries apparentées, comme cela était le cas en période froide, mais également à *Lpn*, et à l'ensemble des communautés bactérienne et eucaryotique. D'une manière générale, lorsqu'un paramètre est favorable à *Lpn*, il ne l'est pas pour les bactéries du groupe "*Pseudomonas* et bactéries apparentées". L'antagonisme entre ces deux groupes peut être apparent et provenir uniquement d'une réponse différente vis-à-vis des modifications environnementales. La température, ainsi que les concentrations de sodium et de magnésium, ont un rôle important dans le développement de *Lpn* dans les biofilms.

6.3 Conclusions de l'étude du réseau hydrographique Aixois

La présence de rejets contaminés par *Lpn* dans le réseau aixois a permis une étude plus précise des conditions environnementales qui expliquent le maintien, voire le développement, de cette bactérie dans les biofilms naturels. Les conditions favorables à *Lpn*, tout au long du réseau, varient à la fois dans l'espace et dans le temps (entre une saison chaude : en juin 2008/09 et en septembre 2008; et une saison froide : en décembre 2007/08 et en mars 2009). Nous avons déjà fait ce constat au sujet des biofilms des principaux affluents du lac du Bourget (Chapitre 5.7).

Cette première étude du réseau récepteur des sources thermales a permis de montrer que les modifications physico-chimiques engendrées par les arrivées d'eaux thermales sont perceptibles sur l'ensemble du réseau où elles influencent le développement des biofilms et plus particulièrement de *Lpn*. Un second point d'importance pour ce réseau est celui de la confluence avec le Tillet. Cet apport apparaît même plus important pour le développement de l'ensemble de la communauté bactérienne du biofilm que l'apport d'eaux thermales.

Cette étude a également mis en évidence le maintien de la présence des différents états physiologiques de *Lpn* dans les biofilms à l'aval du point de contamination jusqu'à la confluence avec le lac. Un retour à une concentration inférieure à celle de la station Mirabeau reste occasionnellement observé. Ce retour à la concentration d'origine est la preuve de l'existence de mécanismes d'autoépuration le long du cours d'eau. Malgré un effet moins marqué sur la forme cultivable de *Lpn*, il semblerait que la vitesse et la température soient les deux facteurs principaux intervenant dans son maintien. L'influence de ces deux paramètres a été étudiée plus spécifiquement dans le cadre d'expériences basées sur des réacteurs biologiques décrites dans les chapitres 7 et 8.

L'un des objectifs de cette partie de l'étude était de rechercher, dans le cas particulier des conditions environnementales de nos sites d'étude, l'existence éventuelle de l'antagonisme *Lpn* - *P. aeruginosa* qui a souvent été mis en évidence dans les conditions expérimentales (Borella, *et al.*, 2004, Borella, *et al.*, 2005, Declerck, *et al.*, 2005). Les techniques utilisées dans ce travail n'étaient pas suffisamment sélectives pour pouvoir affirmer que toutes les bactéries dénombrées appartenaient à l'espèce *P. aeruginosa*. Ce sont donc les relations entre *Lpn* et un groupe que nous avons intitulé "Pseudomonas et bactéries apparentées" qui ont été analysées. Nos résultats montrent que ce qui semble être un antagonisme entre ce groupe et *Lpn* est effectivement observé dans certains groupes d'échantillons, probablement en liaison avec des conditions particulières qui n'ont pu être définies plus précisément dans le cadre de cette étude (rappelons que ce constat n'est basé que sur l'analyse des résultats de la station Liège ou sur l'analyse de 2 campagnes seulement : juin et décembre 2008). Il a été retrouvé par la suite dans le groupe des stations aval en période chaude. Le Tableau 86 réunit, dans chaque groupe de données, les corrélations associées spécifiquement à chacun des deux groupes bactériens ainsi que celles qui leur sont communes (4^{ème} colonne). Il montre que des descripteurs biologiques semblent être plus associés à *Lpn* qu'aux bactéries du groupe "Pseudomonas et bactéries apparentées". Par ailleurs, les corrélations qui leur sont communes semblent impliquer essentiellement des descripteurs abiotiques.

De nombreuses corrélations font intervenir un descripteur physico-chimique et un descripteur biologique. Lorsque de telles corrélations ont été identifiées, il a rarement été possible d'en préciser la nature. Dans certains cas les deux descripteurs corrélés peuvent répondre à un troisième facteur, qui n'a pas été pris en considération dans le cadre de l'étude. En conséquence, beaucoup d'hypothèses ont été formulées dans ce chapitre, chacune pourrait justifier de la prolongation du travail par d'autres expérimentations.

Les résultats suggèrent enfin l'existence, dans certains contextes (groupe Liège Lepic Aquarium - Période Froide, par exemple), du développement intra-cellulaire de *Lpn* dans les amibes et, en correspondance, une liaison avec l'augmentation de la concentration de *Lpn*_{cultivables}.

Tableau 86 : Comparaison des corrélations observées dans chaque groupe de station pour les différents descripteurs de *Lpn* et/ou des bactéries du groupe "*Pseudomonas* et bactéries apparentées". Le signe (+/-) indique le sens de la corrélation

Groupe de stations	Corrélation avec <i>Lpn</i> mais pas avec le groupe " <i>Pseudomonas</i> et bactéries apparentées"	Corrélation avec le groupe " <i>Pseudomonas</i> et bactéries apparentées" mais pas avec <i>Lpn</i>	Corrélation avec <i>Lpn</i> et le groupe " <i>Pseudomonas</i> et bactéries apparentées"
Groupe Mirabeau	pH - % <i>Lpn</i> _{totales} (-), <i>Lpn</i> _{totales} /amibes (-) Potassium - <i>Lpn</i> _{totales} /amibes (-) Phosphates - <i>Lpn</i> _{totales} (-) Bactéries totales - <i>Lpn</i> _{totales} (+)	Température médiane - " <i>Pseudomonas</i> _{FISH} et bactéries apparentées" (-) COD - " <i>Pseudomonas</i> _{FISH} et bactéries apparentées" (-)	
Groupe Parking	Débit médian - <i>Lpn</i> _{totales} /amibes (+) Matière organique du biofilm - <i>Lpn</i> _{totales} (+) Bactéries _{cultivables} - <i>Lpn</i> _{totales} (-)	Potassium - % " <i>Pseudomonas</i> _{cultivables} et bactéries apparentées" (+) pH - " <i>Pseudomonas</i> _{FISH} et bactéries apparentées" (-), % " <i>Pseudomonas</i> _{FISH} et bactéries apparentées" (-) Poids sec biofilm - " <i>Pseudomonas</i> _{FISH} et bactéries apparentées" (+) Sulfates - " <i>Pseudomonas</i> _{cultivables} et bactéries apparentées" (+)	
Groupe Liège Lepic Aquarium - Période Froide	Débit médian pré-incubation - <i>Lpn</i> _{totales} (+) Magnésium - <i>Lpn</i> _{totales} (-) Protistes, Amibes - <i>Lpn</i> _{cultivables} (-)	Température, Degré jour - " <i>Pseudomonas</i> _{cultivables} et bactéries apparentées" (+) COD - % " <i>Pseudomonas</i> _{FISH} et bactéries apparentées" (-) Phosphates - " <i>Pseudomonas</i> et bactéries apparentées" (-) Calcium - % " <i>Pseudomonas</i> _{cultivables} et bactéries apparentées" (-)	Débit médian incubation - <i>Lpn</i> _{totales} , " <i>Pseudomonas</i> _{cultivables} et bactéries apparentées", % " <i>Pseudomonas</i> _{cultivables} et bactéries apparentées" (+) Matière organique du biofilm - <i>Lpn</i> et " <i>Pseudomonas</i> et bactéries apparentées" cultivables
Groupe Liège Lepic Aquarium - Période Chaude	Température - <i>Lpn</i> _{cultivables} (+), <i>Lpn</i> _{totales} (+), % <i>Lpn</i> _{cultivables} (+) COD - % <i>Lpn</i> _{totales} (-), % <i>Lpn</i> _{cultivables} (-) Magnésium - <i>Lpn</i> _{totales} (+), <i>Lpn</i> _{cultivables} (+), % <i>Lpn</i> _{totales} (+), % <i>Lpn</i> _{cultivables} (+) Amibes - <i>Lpn</i> _{totales} (+), <i>Lpn</i> _{cultivables} (+)	Potassium - " <i>Pseudomonas</i> _{cultivables} et bactéries apparentées" (+) Sulfates - % " <i>Pseudomonas</i> _{cultivables} et bactéries apparentées" (-) Bactéries _{cultivables} - " <i>Pseudomonas</i> _{cultivables} et bactéries apparentées" (+)	Conductivité - <i>Lpn</i> _{cultivables} (+), % <i>Lpn</i> _{cultivables} (+), <i>Lpn</i> _{cultivables} /amibes (+), % " <i>Pseudomonas</i> _{cultivables} et bactéries apparentées" (+), " <i>Pseudomonas</i> _{FISH} et bactéries apparentées" (-) Calcium - <i>Lpn</i> _{totales} /amibes (+), % " <i>Pseudomonas</i> _{cultivables} et bactéries apparentées" (+) Chlorures - <i>Lpn</i> _{cultivables} (+), % " <i>Pseudomonas</i> _{FISH} et bactéries apparentées" (-), % " <i>Pseudomonas</i> _{cultivables} et bactéries apparentées" (+) Sodium - " <i>Pseudomonas</i> _{FISH} et bactéries apparentées" (-), <i>Lpn</i> _{totales} (+), <i>Lpn</i> _{cultivables} (+), % <i>Lpn</i> _{cultivables} (+), <i>Lpn</i> _{cultivables} /amibes (+)

7 - Effets particuliers de la vitesse de l'eau

Comme cela a été évoqué dans les parties précédentes, l'augmentation de la vitesse de l'eau peut se traduire comme un stress dû à l'augmentation des forces de cisaillement, mais également comme un facteur favorable au développement du biofilm en améliorant à la fois le renouvellement des nutriments et l'évacuation des déchets dans les parties profondes du biofilm.

L'utilisation de réacteurs biologiques a permis d'étudier plus précisément l'effet de la vitesse de l'eau sur le développement du biofilm et sur le maintien de la présence de *Lpn*. Rappelons ici que les biofilms placés dans les réacteurs sont âgés de 7 jours et proviennent de la bêche de rejet des Thermes Chevalley (chapitre 3.3.1). Leur suivi est ensuite effectué pendant 18 jours à travers le prélèvement d'une lame de verre (substrat artificiel) dans chaque carrousel aux dates suivantes : jour 0-1-2-4-7-9-11-14-16 et 18. Les réacteurs sont placés au laboratoire, à température ambiante et à l'obscurité. Ils sont alimentés par de l'eau prélevée quotidiennement dans la Leysse.

Deux vitesses de rotation des carrousels ont été testées successivement :

- 2 tours/min soit 1.05 cm/s ;
- 25 tours/min soit 13.1 cm/s.

Le choix de ces vitesses a été effectué sur la base des vitesses les plus fréquemment rencontrées dans le réseau aixois à l'aval de la confluence avec les eaux thermales (Figure 167) mais aussi en fonction des contraintes techniques des réacteurs.

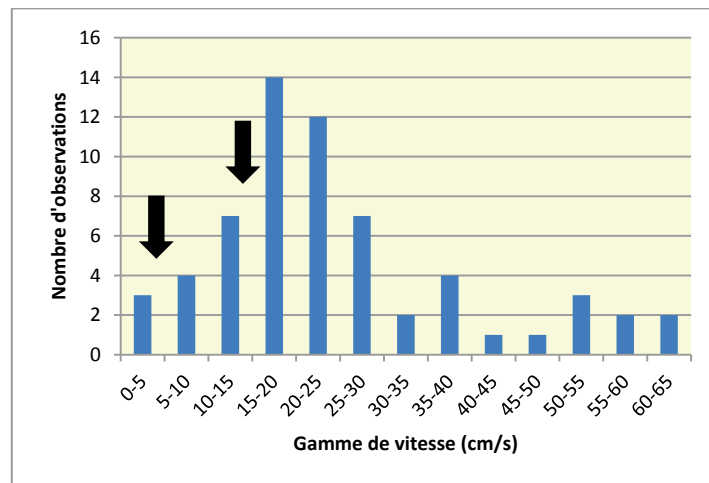


Figure 167 : Nombre d'observations appartenant à chaque gamme de vitesse au niveau de la station Parking lors des mesures effectuées dans le cadre des jaugeages pour l'étalonnage des limnigraphes. Les vitesses testées appartiennent aux deux classes signalées par les flèches.

Trois séries d'expérimentations ont été effectuées à différentes périodes de l'année (Tableau 87). Pour chaque série, les deux vitesses n'ont pas été testées simultanément, car un seul banc de réacteurs était disponible, le second étant utilisé pour la mise au point de l'automate nécessaire à l'étude de l'effet de la température de l'eau sur le développement du biofilm. Les biofilms placés dans les réacteurs au début de chaque essai sont donc différents pour les deux vitesses testées. Le deuxième banc de réacteurs a été disponible une semaine après le début de la troisième expérimentation. Ce délai est donc celui qui sépare les essais.

Tableau 87 : Dates du transfert des biofilms depuis la bache de rejet vers les réacteurs (Jour 0) pour chaque vitesse de chaque expérimentation.

	V1 = 1.05 cm/s	V2 = 13.1 cm/s
Exp. A	14 avril 2008	05 mai 2008
Exp. B	04 août 2008	08 Juillet 2008
Exp. C	02 mars 2009	09 mars 2009

Cette partie de l'étude avait pour objectif de simuler l'effet des forces de cisaillement sur l'évolution des biofilms. Ces derniers étaient analysés uniquement à travers des descripteurs biologiques : bactéries_{totales}, bactéries_{cultivables}, $Lpn_{totales}$, $Lpn_{cultivables}$, protistes (pour certains essais uniquement) ainsi que par le calcul de certains des rapports entre ces descripteurs.

Toutes les comparaisons des données ont été effectuées par le test de rang U de Mann-Whitney. Les résultats obtenus sont présentés à la fin de ce chapitre dans le Tableau 100 pour les comparaisons en fonction de la vitesse à chaque date et dans le Tableau 101 pour la comparaison entre le J0 et J18 de chaque vitesse.

7.1 Evolution de la concentration des bactéries_{totales}

Nous nous sommes tout d'abord intéressés à la concentration des bactéries_{totales} et plus particulièrement à l'effet de l'augmentation de la vitesse de l'eau sur l'homogénéité des triplicats, constitués rappelons-le par chacun des trois réacteurs du banc utilisé à chaque essai.

Quelle que soit l'expérimentation considérée, l'augmentation de la vitesse n'a pas d'incidence sur l'homogénéité des triplicats (Tableau 88). L'hétérogénéité des triplicats à J0 semble donc se perpétuer tout au long du suivi indépendamment de la vitesse. Par ailleurs, la plus grande dispersion des valeurs des CV_{MAD} associée à la première expérimentation pourrait également être due à un effet « opérateur », les trois expérimentations ayant été effectuées par trois stagiaires différents.

Tableau 88 : Variabilité (MAD/Médiane) inter-réplicats de la concentration de bactéries_{totales} (CV_{MAD}).

	Exp. A		Exp. B		Exp. C	
	1.05 cm/s	13.1 cm/s	1.05 cm/s	13.1 cm/s	1.05 cm/s	13.1 cm/s
J0	19%	24%	9%	7%	6%	0%
J1	32%	11%	0.3%	12%	0.6%	2%
J2	39%	6%	2%	7%	6%	2%
J4	4%	31%	2%	7%	1%	12%
J7	18%	38%	3%	7%	1%	0%
J9	21%	22%	0%	2%	7%	0%
J11	23%	11%	2%	7%	1%	8%
J14	2%	6%	2%	4%	4%	15%
J16	10%	7%	11%	4%	1%	10%
J18	46%	0%	3%	5%	9%	3%

Nous nous sommes tout d'abord intéressés à l'ensemble de la communauté bactérienne du biofilm à travers le suivi de la concentration des bactéries_{totales}, pour laquelle nous observons un comportement variable au cours des trois expérimentations réalisées pour chacun des deux « essais vitesse » (V1=1.05 cm/s et V2=13.1 cm/s, Figure 168). Cette variabilité est probablement liée au fait que les biofilms étaient à chaque fois différents (malgré une durée de colonisation identique dans la bache de rejet). Elle peut également être due aux variations de la composition de l'eau de la rivière (à partir de laquelle les réacteurs étaient alimentés) entre deux expérimentations. Du fait de ces différences, nous avons choisi de comparer les effets des deux vitesses testées dans le cadre de chacune des dates d'expérimentation (Expériences A, B, C).

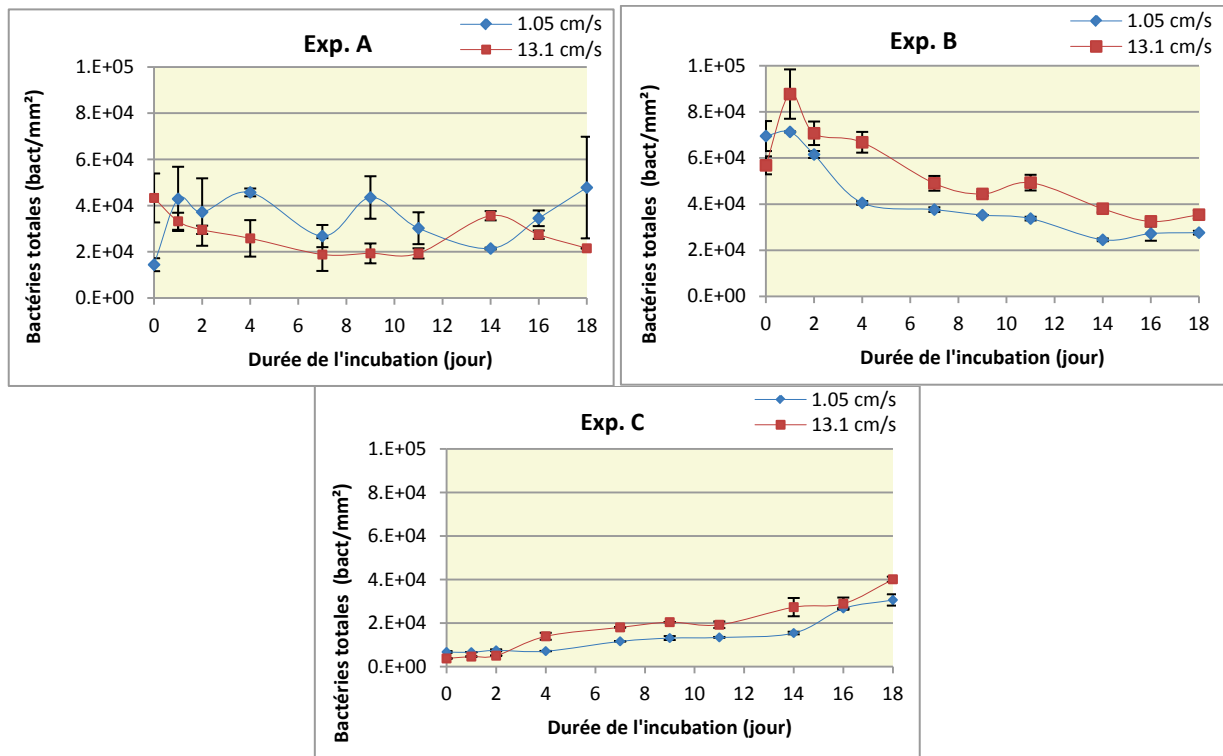


Figure 168 : Evolution de la concentration bactérienne des biofilms (DAPI) en fonction de la vitesse de l'eau. Les barres d'erreurs correspondent au MAD.

Le premier essai, effectué au printemps 2008 (**Exp. A**), montre l'existence, pour la plus faible vitesse de rotation, d'une augmentation de la concentration des bactéries_{totales} immédiatement après le transfert des biofilms dans les réacteurs (Figure 168). Dans ce cas, nous pouvons faire l'hypothèse d'un effet négligeable des forces de cisaillement. Par contre, un phénomène de levée d'inhibition par rupture des gradients lors du passage des biofilms depuis la bêche (milieu pauvre) vers les réacteurs alimentés par l'eau de la Leyse, plus riche en nutriments, peut être responsable de cette augmentation de la concentration des bactéries_{totales}. A l'opposé, cette dernière semble décroître (différence entre J0 et J1 non significative) dans le cas de la vitesse la plus élevée. L'augmentation des forces de cisaillement peut évidemment avoir été déterminante dans ce cas. Cependant le test ayant été réalisé un mois plus tôt que celui de la vitesse lente, il est également possible que l'eau de la Leyse utilisée ait été moins riche en nutriments et qu'elle n'ait pas conduit à l'établissement de gradients significatifs. Dans ce cas l'augmentation de la vitesse de l'eau n'aurait pas changé significativement la distribution des nutriments entre l'eau libre et le biofilm.

Le comportement différent entre les deux « essais vitesses » peut également s'expliquer par la différence de concentration des bactéries_{totales} à J0 entre les deux essais : la concentration bactérienne était bien supérieure dans le cas de la vitesse la plus grande (4.3×10^4 bact/mm² pour la vitesse de 13.1 cm/s et 1.4×10^4 bact/mm² pour la vitesse de 1.05 cm/s).

La Figure 168 et le Tableau 89 montrent que sur l'ensemble des 18 jours d'observation, l'évolution de la concentration des bactéries_{totales} est différente selon la vitesse de rotation appliquée aux biofilms. En effet, avec la vitesse la plus lente, une fois passée l'augmentation évoquée ci-dessus, la concentration oscille entre 2.14×10^4 et 4.78×10^4 bact/mm². La vitesse de rotation la plus rapide semble induire une tendance à la baisse de la concentration des bactéries_{totales}, malgré une légère réaugmentation au 14^{ème} jour du suivi (3.56×10^4 bact/mm²). Les derniers biofilms prélevés ont une concentration de bactéries_{totales} de 2.15×10^4 bact/mm². Notons également qu'à partir du 4^{ème} jour et à l'exception du 14^{ème} jour, la concentration des bactéries_{totales} est inférieure dans les biofilms soumis à la vitesse la plus importante.

Ces observations suggèrent une influence négative de la vitesse de rotation sur le développement de la communauté bactérienne du biofilm probablement en raison d'un processus constant d'érosion de la surface du biofilm qui s'accroît, en toute logique, avec l'augmentation de la vitesse.

Le deuxième essai (**Exp. B**) a été réalisé en période estivale, en juillet pour la vitesse la plus rapide, en août pour la vitesse la plus lente. Dans les deux cas, la température ambiante médiane a été de 19°C et ne peut donc pas expliquer les différences observées. Il est possible par contre, que la concentration en nourriture de l'eau de la Leyse ait été légèrement plus petite en juillet qu'en août en liaison avec une photosynthèse, elle aussi, légèrement plus faible, libérant moins de sucres dans l'eau au plus fort de la production (« excès » de production primaire). La concentration des bactéries_{totales} à J0 est légèrement supérieure dans les biofilms utilisés avec la vitesse la plus lente (6.95×10^4 bact/mm²) par rapport à ceux soumis à la vitesse la plus forte (5.68×10^4). Comme lors du premier essai, on retrouve un phénomène de stimulation de la concentration des bactéries_{totales} en raison de la rupture des gradients immédiatement après le transfert des biofilms dans les réacteurs. Mais, à l'inverse du premier essai, ce phénomène n'est visible qu'avec la vitesse de rotation la plus importante (Figure 168 et Tableau 89). La concentration bactérienne supérieure à J0 pour la vitesse la plus lente pourrait être à l'origine de la disparition de ce phénomène. Ce phénomène peut aussi s'expliquer par la lenteur de la rotation des biofilms dans les réacteurs : les conditions hydrodynamiques se rapprochent alors des conditions pseudo-stagnantes de la bêche, et permettent un moins bon apport des nutriments dans les parties profondes des biofilms ainsi qu'une moins bonne évacuation des déchets métaboliques qui, de ce fait, limitent la rupture des gradients lors du transfert des substrats artificiels dans les réacteurs.

Après 24h dans les réacteurs et en raison du phénomène précédent, la concentration des bactéries_{totales} dans le réacteur où la vitesse est la plus forte (8.77×10^4 bact/mm²) devient supérieure à celle de l'autre réacteur (7.13×10^4 bact/mm²). Quelle que soit la vitesse testée la concentration de bactéries_{totales} diminue ensuite progressivement entre J1 et J18 pour atteindre une valeur de 2.76×10^4 bact/mm² pour la vitesse lente et de 3.54×10^4 bact/mm² pour la vitesse rapide.

Contrairement à l'expérience A, l'expérience B suggère une influence positive de la vitesse de l'eau sur le développement bactérien du biofilm. En effet, son augmentation favorise la multiplication bactérienne par rupture des gradients immédiatement après le transfert des lames. Sur l'ensemble de la période suivie, l'augmentation de l'érosion due à l'augmentation des forces de cisaillement semble compensée par une multiplication plus intense des bactéries du biofilm probablement grâce à une meilleure circulation de l'eau dans les parties profondes du biofilm. L'eau interstitielle du biofilm doit alors avoir une composition proche de celle de l'eau alimentant les réacteurs dans le cas de la vitesse la plus importante.

Le dernier essai (**Exp. C**) a eu lieu en sortie de période hivernale, au cours du mois de mars 2009. La concentration bactérienne des biofilms à la sortie de la bêche était plus faible pour les biofilms utilisés avec la vitesse la plus rapide (3.72×10^3 bact/mm²) que celle des biofilms soumis à la vitesse la plus faible (6.70×10^3 bact/mm²). Ces biofilms ont été ceux dont le développement était le plus faible parmi ceux de l'ensemble des trois essais. Ceci peut s'expliquer par la période de développement du biofilm (dans la bêche) située peu après la période de fermeture de l'établissement thermal pour nettoyage et évacuation des boues déposées tout au long de l'année au fond de la bêche. Il s'agit également d'une période durant laquelle la fréquentation de l'établissement thermal reste faible.

Quelle que soit la vitesse à laquelle sont soumis les biofilms, on n'observe pas de rupture des gradients au premier jour dans les réacteurs, mais plutôt une augmentation progressive de la concentration bactérienne des biofilms tout au long de l'incubation (Figure 168 et le Tableau 89). La concentration finale est de 3.06×10^4 pour la vitesse la plus lente et de 4.01×10^4 bact/mm² pour la plus rapide. L'augmentation de la concentration bactérienne est donc plus importante dans le cas de la plus grande vitesse : la concentration des bactéries totales augmente de 3.64×10^4 bact/mm² soit presque de 10 fois la concentration du biofilm lors de son transfert dans les réacteurs. L'augmentation n'est que de 2.39×10^4 bact/mm² soit 3.6 fois la concentration à J0 dans les biofilms soumis à la vitesse la plus lente. De plus, à partir du deuxième jour, les concentrations des bactéries_{totales} sont significativement supérieures dans les biofilms subissant les plus fortes vitesses de rotation.

Comme au cours de l'essai précédent, la vitesse favorise donc le développement bactérien du biofilm (bactéries_{totales}). Là encore un meilleur renouvellement des nutriments dans les parties profondes du biofilm lors de l'augmentation de la vitesse de rotation peut être un facteur explicatif de cette observation. L'absence de rupture des gradients immédiatement après le transfert des biofilms, peut s'expliquer par une différence trop faible de la concentration en nutriments entre l'eau de la bêche et l'eau de la Leysse.

Tableau 89 : Effet du transfert des biofilms dans les réacteurs et de l'ensemble de l'incubation sur les concentrations des bactéries_{totales} pour chaque vitesse de chaque expérience.
($\% = (\Delta \text{concentration} / \text{concentration à J0}) * 100$)

	1.05 cm/s		13.1 cm/s	
	$\Delta J0-J1$	$\Delta J0-J18$	$\Delta J0-J1$	$\Delta J0-J18$
Exp. A	+198%	+232%	-23%	-50%
Exp. B	+2%	-60%	+54%	-37%
Exp. C	-1%	+357%	+23%	978%

Les valeurs de vitesse testées montrent que l'augmentation de la vitesse est favorable au développement bactérien, principalement à travers un meilleur renouvellement de l'eau dans les parties profondes du biofilm. La première expérimentation fait cependant apparaître que dans des conditions particulières, l'effet abrasif peut être plus important et peut limiter alors le développement bactérien du biofilm dans le cas de la vitesse la plus grande.

7.2 Evolution de la communauté bactérienne cultivable du biofilm

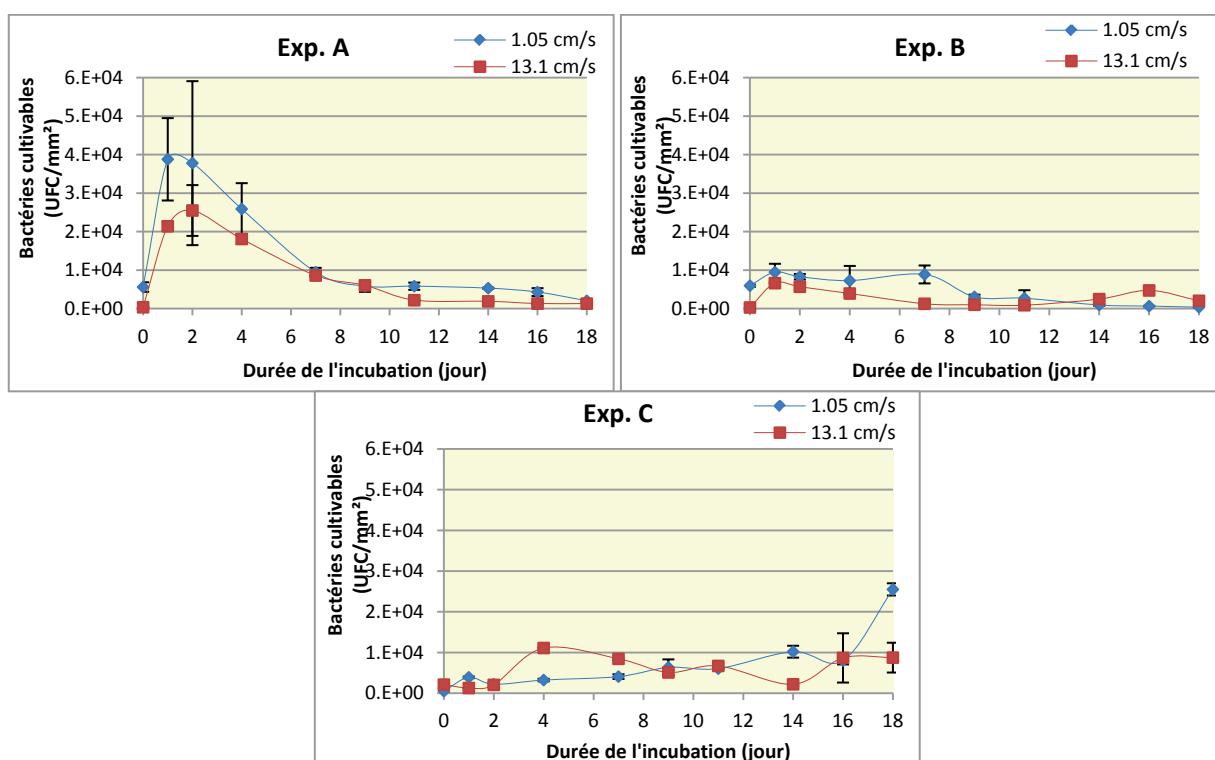
7.2.1 Concentration des bactéries_{cultivables}

La vitesse de rotation des carrousels n'influence pas l'homogénéité des concentrations des bactéries_{cultivables} des biofilms (Tableau 90). Les valeurs des CV_{MAD} restent généralement inférieures à 30% ce qui est correct pour des échantillons qui se sont développés dans des conditions naturelles. Contrairement à la dispersion mesurée pour les bactéries_{totales}, on ne retrouve pas d'effet dû à la période à laquelle a été effectué le suivi, ou dû à l'opérateur.

Tableau 90 : Variabilité (MAD/Médiane) inter-réplicats de la concentration des bactéries_{cultivables} (CV_{MAD}).

	Exp. A		Exp. B		Exp. C	
	1.05 cm/s	13.1 cm/s	1.05 cm/s	13.1 cm/s	1.05 cm/s	13.1 cm/s
J0	22%	4%	5%	12%	14%	14%
J1	28%	6%	23%	3%	5%	8%
J2	56%	26%	9%	14%	16%	29%
J4	26%	7%	52%	4%	10%	2%
J7	12%	0%	26%	24%	14%	3%
J9	25%	16%	19%	16%	31%	13%
J11	16%	7%	78%	5%	2%	7%
J14	3%	27%	23%	17%	14%	17%
J16	24%	17%	11%	21%	12%	70%
J18	22%	44%	15%	11%	6%	42%

Les observations précédentes ont montré que selon la période à laquelle a été effectuée chaque expérimentation, l'influence de la vitesse sur la concentration des bactéries_{totales} est modifiée. De façon similaire, la période expérimentale semble influencer sur les résultats obtenus lorsque l'on considère la concentration des bactéries_{cultivables} (Figure 169 et Tableau 91).

Figure 169 : Evolution de la concentration médiane en bactéries_{cultivables} en fonction de la vitesse de l'eau. Les barres d'erreurs correspondent au MAD.

Au premier essai (**Exp. A**), à l'inverse des concentrations des bactéries_{totales}, la concentration des bactéries_{cultivables} à J0 dans les biofilms qui sont ensuite soumis à la vitesse de 13.1 cm/s est inférieure à celle des biofilms soumis à la vitesse de 1.05 cm/s. Cette différence significative disparaît ensuite jusqu'au 11^{ème} jour du suivi.

Pour chacune des deux vitesses testées, le premier jour d'incubation se caractérise par une forte augmentation de la concentration des bactéries_{cultivables}. On passe en effet, de 5.61×10^3 à 3.88×10^4 UFC/mm² pour la vitesse de 1.05 cm/s et de 3.64×10^2 à 2.14×10^4 UFC/mm² pour la vitesse de 13.1 cm/s, soit une augmentation respective de 3.32×10^4 UFC/mm² et de 2.10×10^4 UFC/mm². Cette augmentation représente 6 fois la concentration à J0 pour la vitesse lente et 57 fois la concentration à J0 pour la vitesse rapide. Le phénomène de rupture des gradients touche donc également les bactéries sous leur forme cultivable. A l'inverse des bactéries_{totales} pour la même expérimentation, la vitesse la plus importante est responsable de la plus forte augmentation de concentration des bactéries_{cultivables}.

Entre le deuxième et le dernier jour du suivi, la concentration des bactéries_{cultivables} diminue progressivement quelle que soit la vitesse de rotation imposée au biofilm. Cette baisse est plus importante jusqu'au 16^{ème} jour dans le cas de la vitesse la plus grande, ce qui se traduit par une concentration significativement inférieure entre le 11^{ème} et le 16^{ème} jour du suivi. Cette baisse est en effet de 3.35×10^4 UFC/mm² pour la vitesse lente et de 2.42×10^4 UFC/mm² pour la vitesse rapide soit une baisse de respectivement 89% et 95% de la concentration à J2.

Au dernier jour du suivi, il n'existe plus de différence significative de la concentration des bactéries_{cultivables} entre les deux vitesses testées : avec une concentration 131 UFC/mm² pour la vitesse de 13.1 cm/s et de 204 UFC/mm² dans les biofilms soumis à une vitesse de 1.05 cm/s.

Lorsque l'on considère la concentration des bactéries_{cultivables}, l'augmentation de la vitesse se traduit par une réponse plus marquée vis-à-vis du changement de milieu, c'est-à-dire à une plus forte augmentation de la concentration des bactéries_{cultivables}. Après un effet positif de la vitesse lors des premiers jours de l'incubation en réacteur, elle aurait plutôt un effet négatif sur une période plus longue. L'effet de la vitesse s'effectue probablement à travers le renouvellement de l'eau du biofilm et donc des charges transportées dans les premiers jours de l'incubation, puis à travers une érosion liée aux forces de cisaillement au cours des jours suivants.

Lors du deuxième essai (**Exp. B**), la concentration des bactéries_{cultivables} reste inférieure pour la vitesse la plus rapide, depuis la mise en place dans les réacteurs jusqu'au 9^{ème} jour du suivi. Seul le 4^{ème} jour fait exception avec une différence non significative entre la concentration obtenue pour les deux vitesses.

Mais, si l'on s'intéresse à l'augmentation de concentration lors du premier jour dans les réacteurs, là encore, la vitesse joue un rôle déterminant. En effet, pour une vitesse de 1.05 cm/s, la concentration des bactéries_{cultivables} passe de 5.97×10^3 à 9.47×10^3 UFC/mm², soit une augmentation de 3.5×10^3 UFC/mm², c'est-à-dire 0.59 fois la concentration à J0. Pour la vitesse de 13.1 cm/s, la concentration des bactéries_{cultivables} est de 3.06×10^2 UFC/mm² à J0 et de 6.63×10^3 UFC/mm² à J1. L'augmentation est donc de 6.32×10^3 UFC/mm² soit 20 fois la concentration à J0. La vitesse favorise donc la rupture des gradients probablement par un meilleur renouvellement de l'eau interstitielle. Cet effet positif se poursuit tout au long de l'incubation.

A partir du 16^{ème} jour la concentration des bactéries_{cultivables} est significativement supérieure dans les biofilms soumis à la vitesse de rotation de 13.1 cm/s.

Dans les conditions estivales, pour lesquelles la capacité nutritive de l'eau est plus importante qu'au printemps, une vitesse plus importante reste favorable au développement des bactéries_{cultivables} tout au long des 18 jours que dure le suivi.

La troisième expérience (**Exp. C**), en fin de période hivernale, révèle une évolution différente de la concentration des bactéries_{cultivables} lors de l'augmentation de la vitesse. Dans cet essai, la concentration de bactéries_{cultivables} à J0 est significativement supérieure dans les biofilms utilisés avec la vitesse la plus élevée (5.10×10^2 UFC/mm² pour 1.05 cm/s et 2.11×10^3 UFC/mm² pour 13.1 cm/s). Contrairement aux deux premiers essais, le compromis entre l'érosion et la rupture des gradients est en faveur de l'effet favorable de ce dernier, dans le cas de la vitesse de rotation la plus faible entre J0 et J1.

La concentration des bactéries_{cultivables} des biofilms soumis à une vitesse de rotation de 1.05 cm/s diminue entre J1 et J2 avant d'augmenter progressivement jusqu'au dernier jour du suivi. Cette concentration devient supérieure à celle obtenue avec la vitesse la plus rapide après le 11^{ème} jour du suivi.

Pour la vitesse de 13.1 cm/s, le phénomène inverse se produit avec la baisse de la concentration des bactéries_{cultivables} dans les 24h suivant immédiatement le transfert des biofilms dans les réacteurs. Une augmentation de la concentration des bactéries_{cultivables} se produit ensuite entre le 2^{ème} et le 4^{ème} jour de l'incubation (de 2.04×10^3 UFC/mm² à 1.11×10^4 UFC/mm²). Pendant le reste de la période du suivi, la concentration oscille entre une valeur maximale à J4 et une valeur minimale équivalente à celle de J0.

Tableau 91 : Effet du transfert des biofilms dans les réacteurs et de l'ensemble de l'incubation sur les concentrations des bactéries_{cultivables} pour chaque vitesse de chaque expérience.
(%=(Δ concentration/concentration à J0)*100)

	1.05 cm/s		13.1 cm/s	
	Δ J0-J1	Δ J2-J18	Δ J0-J1	Δ J2-J18
Exp. A	+590%	-64%	+5797%	+260%
		J2-16 :-89%		J2-16 :-95%
Exp. B	+59%	-94%	+2065%	+565%
Exp. C	+665%	+4902%	-40%	+314%

D'une manière générale, en période hivernale, une faible vitesse de rotation est plus favorable au développement des bactéries_{cultivables}. Il est possible qu'à cette période l'eau n'apporte pas assez de nutriments au biofilm. L'effet abrasif domine alors l'effet positif lié à l'amélioration de la circulation de l'eau à l'intérieur du biofilm lorsque la vitesse de rotation augmente.

7.2.2 Proportion des formes cultivables dans la communauté bactérienne du biofilm

L'influence de la vitesse de rotation lors des différentes phases du suivi est également visible avec la proportion des bactéries_{cultivables} dans les biofilms (Figure 170).

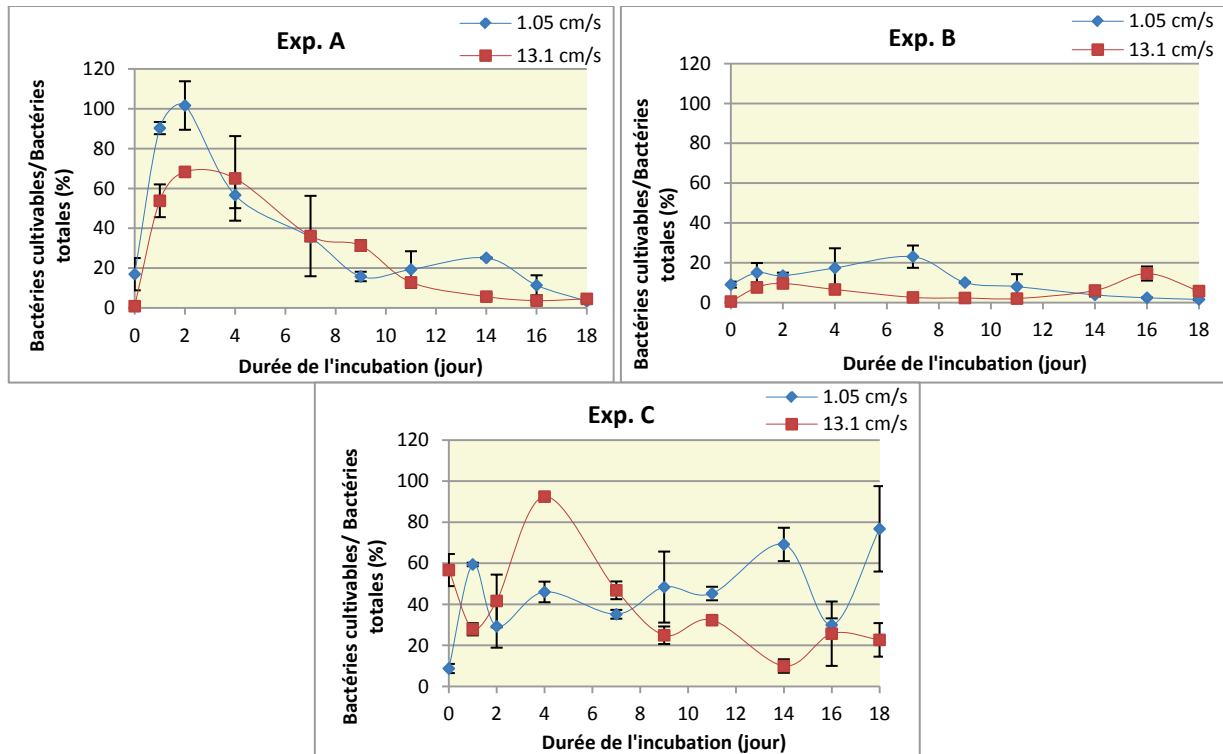


Figure 170 : Evolution de la proportion des bactéries_{cultivables} (bactéries_{cultivables}/bactéries_{totales}) en fonction de la vitesse de l'eau. Les barres d'erreurs correspondent au MAD.

Dans le cas de l'**expérimentation A**, la proportion des bactéries_{cultivables} à J0 est très différente pour les deux essais avec une valeur supérieure pour les biofilms placés dans les réacteurs où la vitesse est la plus faible (17% des bactéries sont cultivables pour la vitesse de 1.05 cm/s et 0.8% pour 13.1 cm/s).

Comme c'était le cas précédemment avec leurs concentrations, la proportion des bactéries_{cultivables}, augmente dans les jours suivant le transfert depuis la bache de rejet vers les réacteurs. Cette augmentation ralentit entre J1 et J2. La fraction bactérienne cultivable passe de 17% à 90% au premier jour et à 100% au deuxième, soit une augmentation de 4 et 5 fois la proportion de départ pour la vitesse de 1.05 cm/s. Avec la rotation à 13.1 cm/s, elle passe de 0.8% à 54% puis à 68%, soit une augmentation de 63 et 80 fois la proportion initiale. Cette augmentation de la proportion des bactéries_{cultivables} montre que la rupture des gradients influence plus particulièrement la forme cultivable des bactéries des biofilms. De plus, cet effet est amplifié avec l'augmentation de la vitesse de rotation.

A partir du 2^{ème} jour, la proportion de bactéries cultivables diminue jusqu'à la fin du suivi. Seule la vitesse la plus lente se traduit par une augmentation de la proportion des bactéries_{cultivables} du 9^{ème} au 14^{ème} jour. Au dernier jour du suivi les proportions des bactéries_{cultivables} sont similaires pour les deux vitesses.

Si l'on considère l'ensemble du suivi, la proportion des bactéries_{cultivables} baisse de 13% lorsque la vitesse est de 1.05 cm/s, tandis qu'elle augmente de 4% pour la plus forte vitesse. Ainsi, la vitesse la plus élevée est la plus favorable à la multiplication des formes bactériennes cultivables au cours de ce premier essai.

Au cours de **l'expérimentation B**, l'évolution des proportions des bactéries_{cultivables} diffère rapidement entre les deux vitesses testées. A J0 la valeur dans les réacteurs où la vitesse la plus importante est significativement différente de celle des réacteurs où elle est la plus faible. Là encore, les résultats obtenus pour chacune des deux vitesses montrent une augmentation de la proportion des bactéries cultivables au premier jour du suivi, et qui se poursuit jusqu'au deuxième jour dans le cas de la vitesse la plus grande. Pour la vitesse la plus lente, la fraction cultivable passe de 9.1% à 15.2% soit une augmentation de 0.67 fois la valeur de départ. Tandis qu'avec la vitesse la plus rapide, la fraction cultivable représente 0.50% des bactéries_{totales} à J0, 7.56% à J1 et 9.58% à J2, soit une augmentation respective de 14 et 18 fois la proportion à J0. La vitesse la plus rapide engendre donc une plus grande augmentation de la proportion des bactéries_{cultivables} lors du passage des biofilms dans les réacteurs.

Lorsque la vitesse est de 13.1 cm/s, la proportion des bactéries_{cultivables} diminue de J2 à J11 puis augmente jusqu'à une valeur maximale observée à J16. Pour la vitesse de 1.05 cm/s, la proportion des bactéries_{cultivables} augmente jusqu'au 7^{ème} jour avant de diminuer jusqu'au dernier jour du suivi. A cette date, les proportions sont quasi identiques pour les deux vitesses testées.

Au cours de **l'expérimentation C**, l'évolution de la proportion des bactéries_{cultivables} est particulière. Dans le cas de la rotation la plus rapide, la proportion à J0 est fortement supérieure à celle rencontrée dans tous les autres cas, avec une valeur de 57%. Le transfert depuis la bêche de rejet vers les réacteurs se traduit tout d'abord par une baisse de cette proportion à J1, où elle atteint 28% avant d'augmenter jusqu'à J4. La communauté bactérienne est alors presque exclusivement dans un état cultivable (92%). La proportion des bactéries_{cultivables} diminue ensuite jusqu'au 9^{ème} jour, avant d'osciller autour d'une valeur de 20%. Cette valeur de 20% reste élevée par rapport aux valeurs observées au cours des expérimentations précédentes.

Dans le cas de la vitesse la plus lente, les biofilms à J0 sont composés d'une communauté bactérienne moins cultivable que ceux de la vitesse la plus rapide, la proportion des bactéries_{cultivables} est seulement de 9%. Contrairement à l'observation effectuée pour la vitesse la plus rapide, le transfert dans les réacteurs engendre ici une augmentation immédiate de la proportion des bactéries_{cultivables}, elle atteint ainsi une valeur de 60% avant de redescendre ensuite à une valeur de 29% à J2. La tendance générale jusqu'à la fin du suivi est une augmentation de la proportion des bactéries_{cultivables} jusqu'à une valeur de 80% environ.

En hiver, les vitesses les plus lentes ont un effet positif sur le caractère cultivable de la communauté bactérienne du biofilm sur l'ensemble de la période suivie. Le caractère nutritif de l'eau, limité à cette période de l'année, ne permet donc pas de limiter l'effet de l'érosion due à l'augmentation des forces de cisaillement.

Tableau 92 : Effet du transfert des biofilms dans les réacteurs et de l'ensemble de l'incubation sur les proportions de bactéries_{cultivables} pour chaque vitesse de chaque expérience.
 $(\% = (\Delta \text{proportion} / \text{proportion à J0}) * 100)$

	1.05 cm/s		13.1 cm/s	
	$\Delta J0-J1$	$\Delta J0-J18$	$\Delta J0-J1$	$\Delta J0-J18$
Exp. A	+434%	-80%	+6302%	+437%
Exp. B	+67%	-82%	+1412%	+1052%
Exp. C	+579%	+778%	-51%	-60%

En hiver, les vitesses les plus lentes ont un effet positif sur le caractère cultivable de la communauté bactérienne du biofilm sur l'ensemble de la période suivie. Le caractère nutritif de l'eau, limité à cette période de l'année, ne permet donc pas de limiter l'effet de l'érosion due à l'augmentation des forces de cisaillement.

L'effet de la vitesse sur la cultivabilité bactérienne résulte de l'équilibre entre l'effet négatif des forces de cisaillement et l'effet positif du meilleur renouvellement des nutriments dans les parties profondes du biofilm.

Il semble que la vitesse ait effectivement un effet sur l'ensemble de la communauté bactérienne du biofilm (totale ou cultivable). L'image de cet effet est cependant brouillée à plusieurs périodes du fait d'une influence notable d'autres descripteurs tels que la composition de l'eau et celle du biofilm. Ce constat explique les différences observées pour chacune des deux vitesses, entre les expériences A, B et C. De ce fait il est difficile de conclure à un effet global manifeste de la vitesse de l'eau sur les biofilms.

D'une manière générale, la vitesse de l'eau et le changement de milieu du biofilm, c'est-à-dire le passage depuis la bêche de rejet vers les réacteurs alimentés en eau de rivière, ont tendance à être favorables à la communauté bactérienne, et plus particulièrement aux bactéries cultivables.

Il est également possible que le changement de vitesse modifie la composition bactérienne du biofilm. Ce paramètre n'a cependant pas pu être pris en considération au cours de cette étude. Nous avons analysé, par contre, l'influence de ces changements de vitesse sur les concentrations et les proportions des différentes formes de *Lpn* dont les résultats font l'objet des chapitres qui suivent.

7.3 Evolution des différentes formes de *Lpn* au sein des biofilms en fonction de la vitesse de rotation

7.3.1 Concentrations en *Lpn*_{totales}

Seul le deuxième essai (**Exp. B**) met en évidence une relation entre la vitesse de rotation des substrats et l'hétérogénéité des concentrations de *Lpn*_{totales} entre les triplicats. Dans ce cas, l'augmentation de la vitesse se traduit par une augmentation de l'hétérogénéité (Tableau 93). Aucun effet de la vitesse n'a été observé sur la dispersion des données dans le cas des deux autres expériences.

Quelle que soit la vitesse, cette deuxième expérience se distingue également des deux autres par une plus grande homogénéité entre les réplicats. Ceci peut refléter l'existence d'un effet « opérateur » comme cela a déjà été évoqué dans le cas des concentrations des bactéries_{totales}.

Tableau 93 : Variabilité (MAD/Médiane) inter-réplicats de la concentration de *Lpn*_{totales} (*CV*_{MAD}).

	Exp. A		Exp. B		Exp. C	
	1.05 cm/s	13.1 cm/s	1.05 cm/s	13.1 cm/s	1.05 cm/s	13.1 cm/s
J0	51%	12%	7%	5%	29%	19%
J1	8%	14%	5%	6%	40%	10%
J2	28%	11%	0%	8%	54%	24%
J4	3%	14%	0%	8%	9%	36%
J7	4%	11%	0%	7%	13%	15%
J9	0%	36%	0%	17%	12%	0%
J11	10%	0%	0%	0%	49%	25%
J14	1%	28%	0%	10%	0%	15%
J16	25%	0%	0%	0%	7%	18%
J18	10%	14%	0%	0%	57%	7%

Les suivis des concentrations de *Lpn*_{totales} au cours de ces trois expérimentations montrent l'importance de la vitesse de l'eau sur le maintien de la présence de *Lpn* dans les biofilms (Figure 171 et Tableau 94).

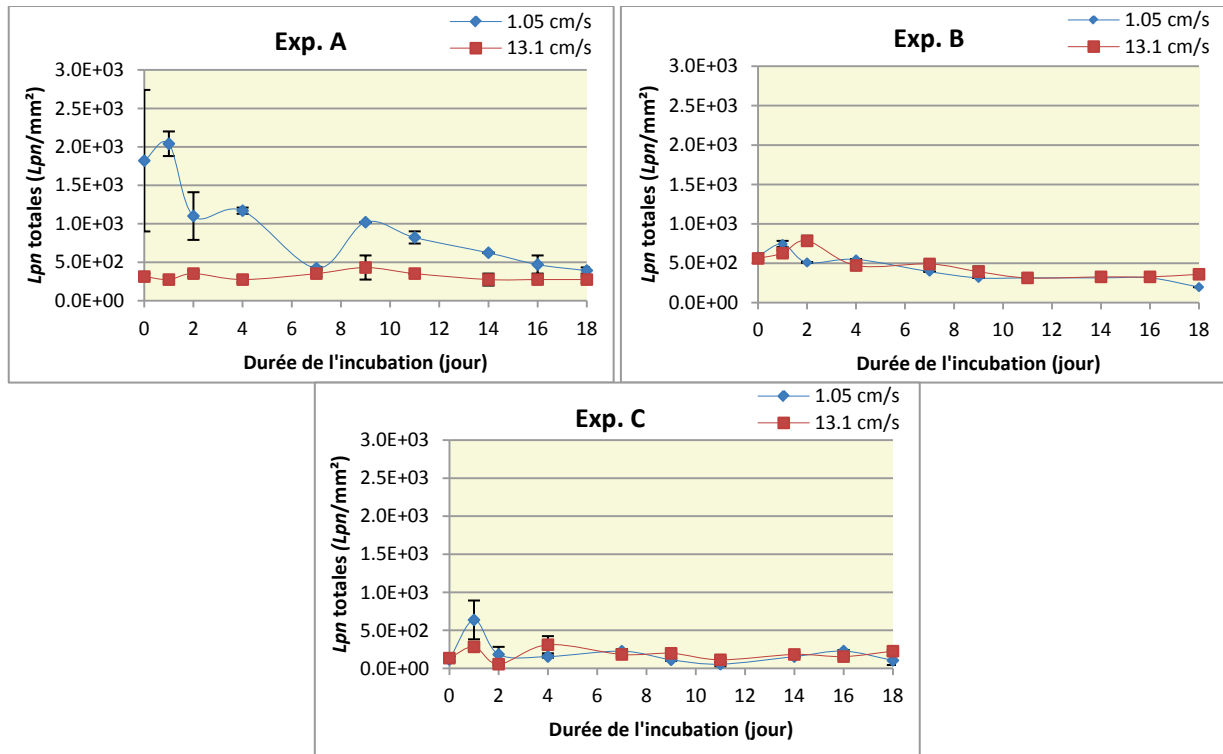


Figure 171 : Evolution de la concentration en Lpn_{totales} (Immunofluorescence) dans les biofilms en fonction de la vitesse de l'eau. Les barres d'erreurs correspondent au MAD.

Au cours du premier essai (**Exp. A**), la concentration de Lpn_{totales} à J0 est significativement différente entre les deux vitesses testées : elle est de 1.82×10^3 Lpn/mm^2 pour la vitesse la plus lente et de 313 Lpn/mm^2 pour la vitesse la plus rapide.

Lors de la rotation la plus lente, la concentration de Lpn_{totales} reste stable au cours du premier jour suivant le transfert. La tendance générale sur l'ensemble du suivi est une diminution de la concentration de Lpn_{totales} de 1428 Lpn/mm^2 soit une baisse de 79% de la concentration à J0.

Avec la vitesse de rotation la plus rapide, une légère baisse de la concentration de Lpn_{totales} est observée suite au transfert des biofilms, elle est immédiatement suivie d'une augmentation au 2^{ème} jour où l'on dénombre 352 Lpn/mm^2 . Puis de légères oscillations, comprises entre 274 Lpn/mm^2 (jours 4, 14, 16 et 18) et 43 Lpn/mm^2 (jour 9), sont observées tout au long du suivi. D'une manière générale, tout au long du suivi, la concentration de Lpn_{totales} baisse de 39 Lpn/mm^2 soit 12.5% de la concentration à J0.

En conclusion, ce premier essai met en évidence le fait que l'augmentation de la vitesse de rotation est favorable au maintien de Lpn_{totales} dans le biofilm. Le meilleur renouvellement des nutriments dans les parties profondes du biofilm lors de l'augmentation de la vitesse de rotation assure alors le maintien de la présence de Lpn du biofilm. Il est également possible que l'augmentation de l'intensité des forces de cisaillement favorise la multiplication intra-amibienne de Lpn leur procurant alors une protection contre l'érosion.

La deuxième expérimentation (**Exp. B**), débute par des concentrations de Lpn_{totales} à J0 qui ne sont pas significativement différentes entre les deux vitesses testées (587 Lpn/mm^2 pour la vitesse de 1.05 cm/s et 560 Lpn/mm^2 pour 13.1 cm/s). Dans les deux cas, une augmentation de concentration est observée lors du passage dans les réacteurs. Mais cette augmentation se limite au premier jour pour la vitesse la plus lente, tandis qu'elle se poursuit au cours du deuxième jour pour la vitesse la plus rapide. Cette augmentation est également plus marquée pour la vitesse la plus rapide puisqu'elle représente une augmentation de 40% de la concentration de départ par rapport à une hausse de 27% pour la rotation la plus lente.

Au cours de la suite du suivi, la concentration de Lpn_{totales} diminue pour la vitesse la plus lente, avec la présence d'un plateau entre les jours 7 et 16 (313 Lpn/mm^2). Pour la vitesse la plus rapide, la baisse de la concentration en Lpn dure jusqu'au 16^{ème} jour, puis semble augmenter légèrement au cours des derniers jours. Sur l'ensemble de la période suivie, la concentration de Lpn_{totales} diminue de 66.5% pour la vitesse lente et de 36% pour la vitesse rapide.

Cette deuxième expérimentation conforte donc les résultats obtenus au cours de la première expérimentation avec un meilleur maintien de Lpn_{totales} dans le biofilm lors de la rotation la plus rapide. On note également que la rupture des gradients est plus importante lors de l'utilisation de la vitesse la plus élevée et qu'elle se maintient sur deux jours au lieu d'un seul comme dans le cas de la plus faible vitesse.

Comme la deuxième expérimentation (Exp. B), l'**Exp. C** débute avec des concentrations de Lpn_{totales} à J0 équivalentes entre les deux vitesses testées. L'évolution de la concentration de Lpn_{totales} présente peu de différences entre les deux vitesses testées. En effet, elle augmente immédiatement après le transfert dans les réacteurs avant de baisser entre le 1^{er} et le 2^{ème} jour. L'augmentation causée par le changement de milieu représente 4 fois la concentration à J0 pour la vitesse la plus faible et deux fois seulement pour la plus élevée. La baisse est ensuite plus importante dans le cas de la vitesse la plus forte (71% pour 1.05 cm/s et 80% pour 13.1 cm/s). Contrairement aux cas précédents, en période hivernale, l'augmentation de la vitesse est défavorable à la rupture des gradients. L'effet positif de l'apport nutritif semble donc négligeable par rapport à l'érosion due aux forces de cisaillement. L'eau est en effet plus pauvre à cette période de l'année par rapport à celle utilisée pour alimenter les réacteurs en fin de printemps ou durant l'été. Il est également possible que la plus faible température de l'eau en hiver explique les différences observées par rapport aux deux premières expérimentations.

Au cours de la suite du suivi, les concentrations de Lpn_{totales} ont tendance à osciller quelle que soit la vitesse imposée aux biofilms. Les concentrations de Lpn_{totales} restent équivalentes entre les deux vitesses à l'exception des jours 4 et 9 pour lesquels la concentration est supérieure pour la plus forte vitesse.

D'une manière générale, sur l'ensemble de la période suivie, la concentration de Lpn_{totales} a tendance à diminuer (baisse de 11% de la concentration à J0) lorsque la vitesse de rotation est de 1.05 cm/s, tandis qu'elle augmente (augmentation qui représente 67% de la concentration à J0) pour la vitesse de 13.1 cm/s. L'augmentation de la vitesse est donc favorable à la concentration de Lpn_{totales} .

Tableau 94 : Effet du transfert des biofilms dans les réacteurs et de l'ensemble de l'incubation sur les concentrations des Lpn_{totales} pour chaque vitesse de chaque expérience.
(%=(Δ concentration/concentration à J0)*100)

	1.05 cm/s		13.1 cm/s	
	Δ J0-J1	Δ J0-J18	Δ J0-J1	Δ J0-J18
Exp. A	+12%	-79%	-1%	-12%
Exp. B	+267%	-67%	+12%	-36%
Exp. C	+114%	-11%	+109%	+67%

Quelle que soit la saison étudiée, l'augmentation de la vitesse de rotation est donc favorable aux concentrations de Lpn_{totales} sur l'ensemble de la période suivie. Tout comme la concentration des bactéries Lpn_{totales} , la concentration de Lpn_{totales} augmente immédiatement après le transfert des biofilms dans les réacteurs pour décroître lentement par la suite.

7.3.2 Proportions de Lpn_{totales}

Les paragraphes précédents ont montrés que l'augmentation de la vitesse favorise à la fois les concentrations des bactéries_{totales} et de Lpn_{totales} . Nous nous sommes également intéressés à l'évolution du rapport Lpn_{totales} /bactéries_{totales} dans les biofilms suivis (Figure 172).

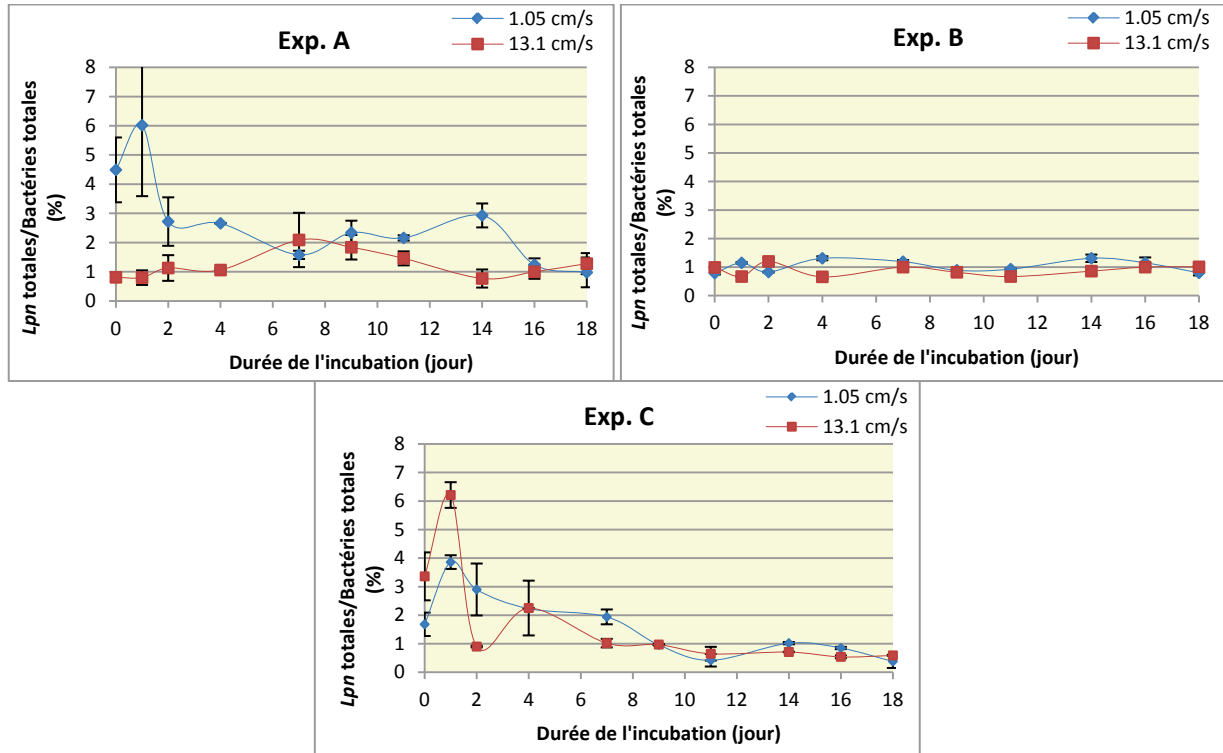


Figure 172 : Evolution de la proportion de Lpn_{totales} (Immunofluorescence) parmi les bactéries des biofilms en fonction de la vitesse de l'eau. Les barres d'erreurs correspondent au MAD.

Les biofilms utilisés à J0 dans l'**expérimentation A** contiennent une forte proportion de Lpn_{totales} lors de l'essai impliquant la vitesse la plus lente. En effet, Lpn_{totales} représentent 4.5% des bactéries des biofilms, ce qui est bien supérieur aux valeurs observées à la fois dans le cas de la vitesse plus rapide (1%) et dans la plupart des biofilms développés dans les cours d'eau (<1% ; chapitre 5.4).

Comme cela était le cas pour les deux descripteurs considérés séparément, le transfert des biofilms dans les réacteurs se traduit au premier jour par une augmentation de la proportion de Lpn_{totales} dans le cas de la rotation la plus lente. Pour cette vitesse, la proportion de Lpn_{totales} diminue ensuite sur l'ensemble de la période considérée.

Lors de la rotation à vitesse rapide le rapport varie entre 0.77% (J14) et 2.09% (J7) tout au long du suivi. A l'exception des jours 7, 9, 16 et 18, la proportion de Lpn_{totales} reste inférieure à celle observée avec la rotation lente.

Sur l'ensemble de la période, cette proportion a tendance à diminuer de 78% en cas de rotation lente, tandis qu'elle augmente de 58% en cas de rotation rapide. Contrairement à J1, pour lequel la vitesse semble défavorable au rapport Lpn_{totales} /bactéries_{totales}, sur l'ensemble du suivi, l'augmentation de la vitesse se traduit par l'augmentation de ce rapport.

L'**expérimentation B** débute avec des biofilms dans lesquels la proportion de Lpn_{totales} n'est pas différente pour les deux vitesses étudiées (0.79% pour 1.05 cm/s et 0.99% pour 13.1 cm/s).

L'effet du transfert dans les réacteurs change en fonction de la vitesse de rotation des carrousels. La vitesse la plus lente favorise Lpn_{totales} tandis que la plus rapide favorise l'ensemble de la communauté bactérienne. En effet, dans le premier cas, l'augmentation du rapport représente 45% de sa valeur à J0, tandis que dans le deuxième cas, la baisse du rapport représente 32% de la valeur à J0.

Entre le 1^{er} et le 2^{ème} jour, l'évolution du rapport s'inverse entre les deux vitesses, les rapports ainsi obtenus à J2 ne sont plus significativement différents. Ce rapport oscille ensuite autour de 1% tout au long de la période suivie pour chacune des deux vitesses testées.

Sur l'ensemble des 18 jours du suivi, la proportion de Lpn_{totales} reste stable : elle passe de 0.79 à 0.80% pour une vitesse de 1.05 cm/s et de 0.99 à 1.01% pour la vitesse de 13.1 cm/s. La vitesse n'influence pas la proportion de Lpn du biofilm. La vitesse a uniquement un effet au cours du premier jour suivant le transfert du biofilm. Dans ce cas, la vitesse de rotation la plus lente permet la plus grande augmentation de la proportion de Lpn .

La réaction différente des biofilms au cours des deux premières expérimentations ne s'explique pas à travers les informations que nous possédons. Ces différences peuvent provenir des changements de la qualité de l'eau entre les mois de mai et de juillet-août, mais également de la composition des biofilms utilisés.

Les biofilms utilisés au début de la troisième expérimentation (**Exp. C**) ne présentent pas de différence significative de la proportion de Lpn_{totales} pour les deux vitesses testées. Le changement de milieu lors du transfert des biofilms dans les réacteurs est plus favorable aux Lpn_{totales} qu'à l'ensemble des bactéries, ce qui se traduit par une augmentation du rapport $Lpn_{\text{totales}}/\text{bactéries}_{\text{totales}}$ entre les jours 0 et 1. L'augmentation représente 1.3 fois le rapport à J0 pour la vitesse lente et 87% du rapport à J0 pour la vitesse rapide. Comme pour les deux premières expérimentations, la vitesse lente se traduit par une augmentation de la proportion de Lpn dans les biofilms lors du changement de milieu.

Puis entre les jours 2 et 18, ce rapport baisse pour chacune des deux vitesses testées. Au 18^{ème} jour, la proportion de Lpn_{totales} est inférieure à celle à J0. La baisse observée sur l'ensemble du suivi représente 77% et 93% de la valeur à J0 pour la vitesse la plus lente et la vitesse la plus rapide respectivement.

Tableau 95 : Effet du transfert des biofilms dans les réacteurs et de l'ensemble de l'incubation sur les proportions de Lpn_{totales} pour chaque vitesse de chaque expérience.
(%=(Δ proportion/proportion à J0)*100)

	1.05 cm/s		13.1 cm/s	
	Δ J0-J1	Δ J0-J18	Δ J0-J1	Δ J0-J18
Exp. A	+34%	+13%	-1%	+58%
Exp. B	+46%	+1%	-32%	+2%
Exp. C	+130%	-77%	+87%	-93%

En période hivernale, l'effet de la vitesse est le même, que l'on considère la période immédiatement après le transfert des lames ou, à plus long terme, sur l'ensemble de la période considérée. L'augmentation de la vitesse va dans le sens d'une baisse de la proportion de Lpn_{totales} dans la communauté bactérienne.

Au cours de tous les suivis effectués, on remarque que les biofilms issus de la bêche de rejet possèdent une proportion de Lpn_{totales} supérieure à celle des biofilms prélevés en rivière (jusqu'à 4.5%).

Après 15 jours dans les réacteurs, ces proportions retombent à des valeurs comprises entre 0.3 et 1.3% ce qui est plus proche des observations effectuées dans les cours d'eau au cours du chapitre 5.4.

Ces expérimentations montrent un effet de la vitesse de l'eau qui diffère en fonction du descripteur considéré. En effet, la vitesse de rotation la plus importante favorise *Lpn* en termes de concentration, mais elle défavorise les proportions de *Lpn* dans les biofilms en raison de l'influence de ce même facteur sur les concentrations en bactéries totales. Ceci montre l'importance du descripteur choisi afin d'évaluer les risques engendrés par la présence de cette espèce potentiellement pathogène.

7.3.3 Concentrations de *Lpn*_{cultivables}

Comme cela est le cas pour la majorité des descripteurs considérés précédemment, les deux vitesses testées ne semblent pas avoir d'impact sur l'homogénéité des concentrations de *Lpn*_{cultivables} mesurées au cours des 3 expérimentations (Tableau 96). Aucun effet « opérateur » n'est visible dans ce cas.

Tableau 96 : Variabilité (MAD/Médiane) inter-réplicats de la concentration de *Lpn*_{cultivables} (CV_{MAD}).

	Exp. A		Exp. B		Exp. C	
	1.05 cm/s	13.1 cm/s	1.05 cm/s	13.1 cm/s	1.05 cm/s	13.1 cm/s
J0	2%	48%	38%	7%	0%	0%
J1	21%	5%	9%	7%	27%	43%
J2	10%	20%	26%	85%	38%	62%
J4	9%	38%	24%	11%	33%	4%
J7	10%	20%	39%	23%	33%	29%
J9	18%	4%	20%	22%	31%	39%
J11	23%	1%	58%	88%	27%	39%
J14	3%	8%	10%	14%	27%	39%
J16	17%	14%	39%	3%	26%	38%
J18	50%	7%	0%	9%	23%	13%

Il est important de considérer également l'effet de la vitesse sur la forme cultivable de *Lpn*, à la fois à travers les suivis de la concentration (Figure 173 et Tableau 97) et ceux de la proportion de la forme cultivable au sein de l'espèce *Lpn* (Figure 174 et Tableau 98).

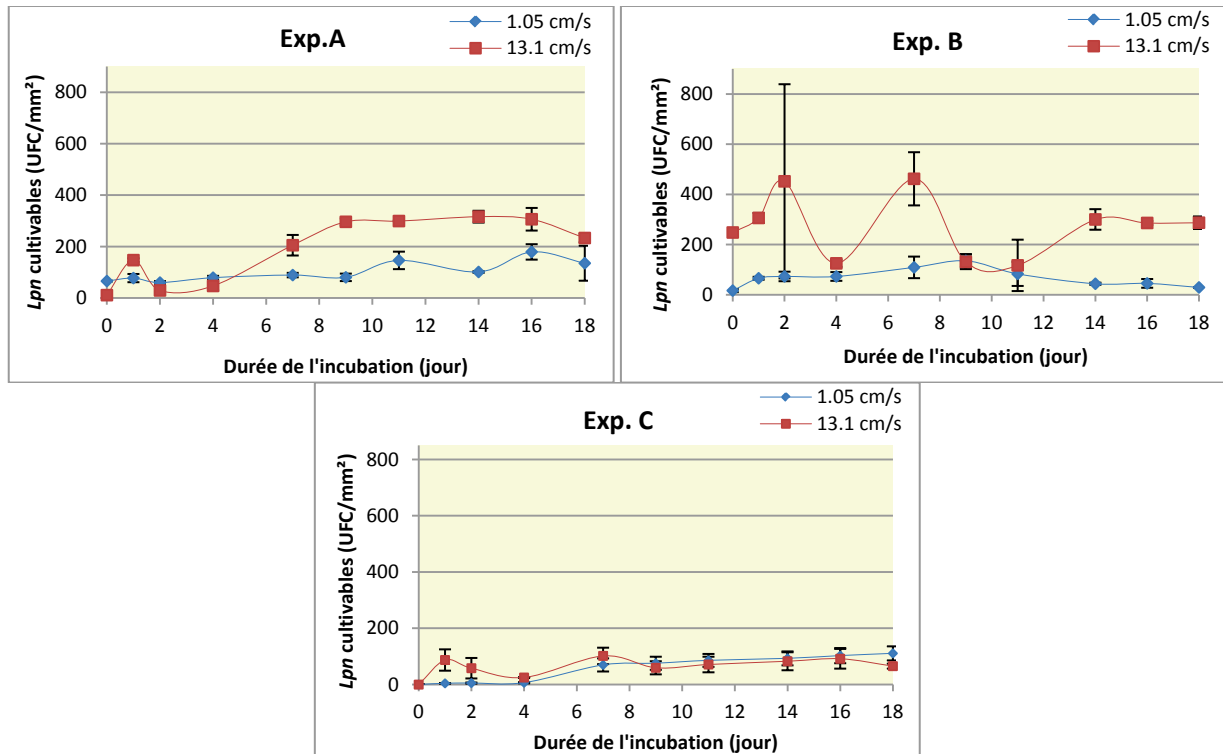


Figure 173 : Evolution de la concentration de $Lpn_{cultivables}$ (GVPC) des biofilms en fonction de la vitesse de l'eau. Les barres d'erreurs correspondent au MAD.

Les biofilms utilisés au cours de la première expérimentation (**Exp. A**) ne présentent pas de différence significative de la concentration de $Lpn_{cultivables}$ à J0.

Comme pour les concentrations des bactéries $Lpn_{cultivables}$, le passage des biofilms dans les réacteurs est responsable d'une augmentation de la concentration de $Lpn_{cultivables}$, et la vitesse la plus importante est responsable de la plus grande augmentation de concentration avec une hausse de 12.5 fois la concentration à J0 contre une hausse de 17.5% de la concentration à J0 pour la vitesse la plus faible.

Au deuxième jour, la concentration de $Lpn_{cultivables}$ retrouve une valeur proche de sa valeur à J0 pour les deux vitesses. Pour les deux vitesses testées, la concentration de $Lpn_{cultivables}$ augmente sur l'ensemble de la période considérée malgré une légère baisse au dernier jour du suivi. L'augmentation de la concentration de $Lpn_{cultivables}$ est plus importante dans le cas de la vitesse la plus rapide. En effet, à la fin du suivi, la concentration de $Lpn_{cultivables}$ a doublé lorsque la rotation est lente, alors que dans le cas de la rotation rapide, l'augmentation représente 20 fois la concentration à J0. De plus, à partir du 7^{ème} jour, les biofilms soumis à la vitesse la plus forte ont une concentration de $Lpn_{cultivables}$ supérieure aux biofilms soumis à la vitesse la plus faible.

Comme pour les descripteurs étudiés précédemment, l'augmentation de la vitesse favorise la multiplication de la forme cultivable de Lpn dans les biofilms provenant de la bêche de rejet de l'établissement thermal.

Pour la deuxième expérimentation (**Exp. B**), la concentration de $Lpn_{cultivables}$ à J0 est différente entre les deux vitesses, avec une valeur élevée dans l'essai faisant intervenir la vitesse rapide. En effet, la concentration est de 16.5 UFC/mm² dans le cas de la vitesse lente et de 248 UFC/mm² dans le cas de la vitesse la plus rapide.

L'augmentation de la concentration de $Lpn_{\text{cultivables}}$ successive au transfert des biofilms dans les réacteurs ne se limite pas au premier jour du suivi, mais elle se poursuit jusqu'au deuxième jour pour les deux vitesses testées. Mais contrairement au premier essai, c'est la vitesse la plus lente qui est ici responsable de l'augmentation la plus importante (3.4 fois la concentration à J0 contre 82% de la concentration à J0 pour la vitesse rapide). La forte concentration de $Lpn_{\text{cultivables}}$ à J0 pour la vitesse de 13.1 cm/s peut permettre d'expliquer cette différence entre les expérimentations A et B.

Sur l'ensemble du suivi, l'évolution de la concentration de $Lpn_{\text{cultivables}}$ est différente en fonction de la vitesse imposée. Soumis à la plus faible vitesse, les biofilms voient leur concentration de $Lpn_{\text{cultivables}}$ augmenter jusqu'au 9^{ème} jour avant une baisse jusqu'à la fin du suivi. Par contre, lorsqu'ils sont soumis à la vitesse la plus importante, leur concentration de $Lpn_{\text{cultivables}}$ présente d'importantes oscillations avant de se stabiliser à partir du 14^{ème} jour autour d'une concentration de 286-300 UFC/mm². La concentration est presque toujours supérieure lorsque la vitesse de rotation est la plus élevée, à l'exception des jours 4, 10 et 11 où la concentration n'est pas significativement différente en fonction de la vitesse.

Sur l'ensemble de la période suivie, la vitesse la plus lente permet une augmentation de la concentration en $Lpn_{\text{cultivables}}$ de 12.6 UFC/mm² soit de 76% de la concentration initiale alors que la vitesse la plus rapide permet une augmentation de 39 UFC/mm² soit 13.5%. Là encore, les fortes concentrations de départ pour la vitesse la plus élevée peuvent permettre d'expliquer le résultat opposé à la première expérimentation.

Au cours de la dernière expérimentation (**Exp. C**), les biofilms à J0 ne contiennent pas de Lpn à l'état cultivable. Ceci peut provenir d'un problème lors d'une des étapes de l'ensemencement. Mais il est également possible que la période de prélèvement des biofilms dans la bêche de rejet des thermes Chevalley en soit la cause. En effet, les substrats ont été placés dans la bêche au cours du mois de janvier 2009, soit quelques semaines après le nettoyage plus important du réseau de l'établissement et après l'évacuation des boues se déposant au fond du bassin. De plus, l'activité thermique est encore assez limitée à cette période de l'année.

A vitesse lente, la concentration de $Lpn_{\text{cultivables}}$ augmente progressivement tout au long du suivi jusqu'à atteindre une concentration de 111 UFC/mm² le dernier jour. A la vitesse plus rapide, le changement de milieu engendre un pic de concentration au premier jour, avec un passage de 0 à 87 UFC/mm² au premier jour suivi d'une baisse jusqu'à 58 UFC/mm² au jour 2. Cette baisse se poursuit ensuite jusqu'au 4^{ème} jour avant d'augmenter sur la suite du suivi et d'osciller entre 65 et 100 UFC/mm². Seuls les quatre premiers jours mettent en évidence une différence significative entre les concentrations observées pour les deux vitesses.

Au cours de la journée qui suit le transfert des biofilms, l'augmentation de la vitesse se traduit par une augmentation plus importante de la concentration de $Lpn_{\text{cultivables}}$. Par contre, à plus long terme, la vitesse n'a pas d'influence sur la concentration de $Lpn_{\text{cultivables}}$ des biofilms.

En période hivernale, il semblerait donc que la régulation de la concentration de $Lpn_{\text{cultivables}}$ se fasse plutôt à travers des facteurs autres que la vitesse de l'eau.

Les premiers jours qui suivent le rejet de fragments de biofilm dans un cours d'eau peuvent être critiques en termes de facteur de risque du fait des concentrations observées à J1.

**Tableau 97 : Effet du transfert des biofilms dans les réacteurs et de l'ensemble de l'incubation sur les concentrations des $Lpn_{cultivables}$ pour chaque vitesse de chaque expérience. (NC=Non Calculable).
($\%=(\Delta\text{concentration}/\text{concentration à J0})\cdot 100$)**

	1.05 cm/s		13.1 cm/s	
	$\Delta J0-J1$	$\Delta J0-J18$	$\Delta J0-J1$	$\Delta J0-J18$
Exp. A	+18%	+107%	+1248%	+2037%
Exp. B	+298%	+76%	+23%	+14%
Exp. C	NC	NC	NC	NC

Les résultats obtenus sur les concentrations de $Lpn_{cultivables}$ sont assez variables selon les expérimentations, mais il semble toutefois que la vitesse augmente les concentrations de $Lpn_{cultivables}$, et ce, même immédiatement après un changement de milieu.

Le fait que la forme cultivable de Lpn soit plus sensible aux différents facteurs environnementaux que l'ensemble des Lpn peut expliquer les différences entre les résultats obtenus à chaque période d'échantillonnage. La composition des biofilms à J0, peut également être en partie responsable des différences observées entre les expérimentations.

7.3.4 Proportions de $Lpn_{cultivables}$

Les évolutions des proportions de $Lpn_{cultivables}$ calculées par rapport aux concentrations de $Lpn_{totales}$ sont représentées dans la Figure 174 et résumées dans le Tableau 98.

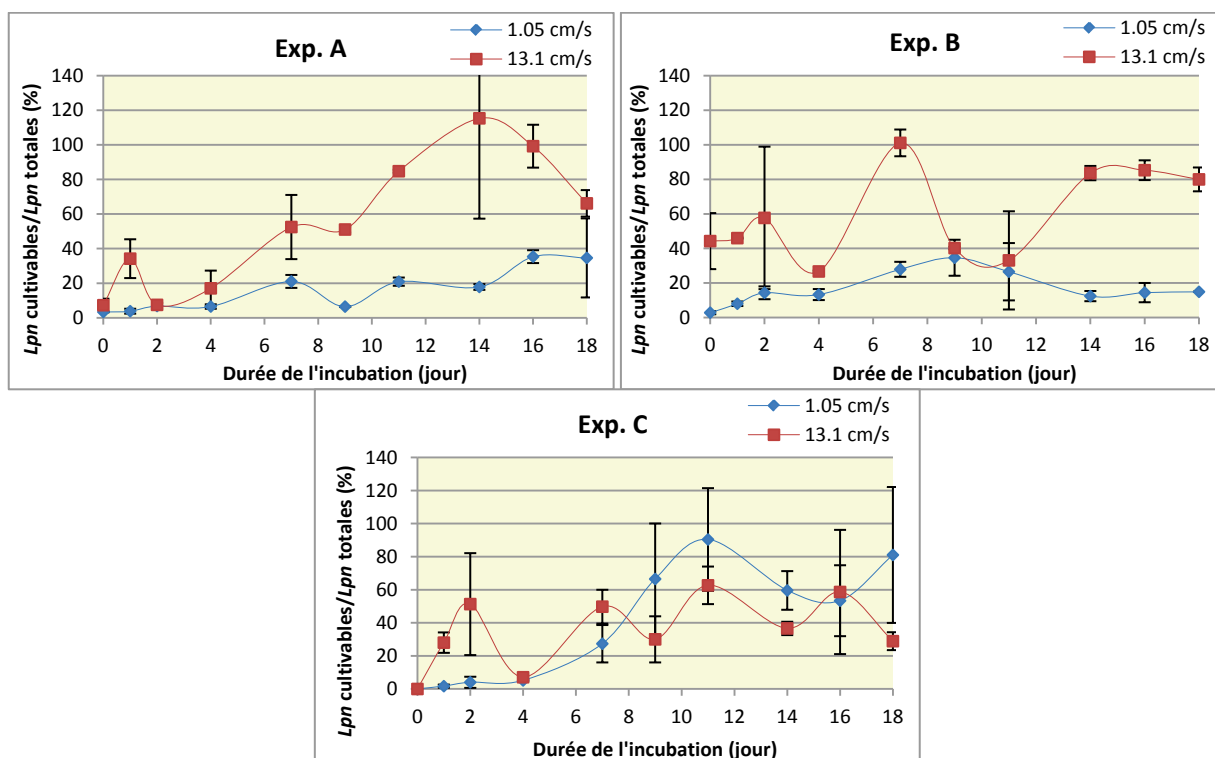


Figure 174 : Evolution des proportions de $Lpn_{cultivables}$ en fonction de la vitesse de l'eau. Les barres d'erreurs correspondent au MAD.

Les proportions de $Lpn_{cultivables}$ à J0 dans les biofilms utilisés pour la première série d'expérimentation (**Exp. A**) sont très proches pour les deux vitesses testées (3.35% à 1.05 cm/s et 7.25% à 13.1 cm/s).

Le transfert des biofilms dans les réacteurs engendre une hausse de la proportion de $Lpn_{\text{cultivables}}$ pendant 2 jours pour la vitesse la plus petite et pendant 1 seul jour pour la plus grande. Cette augmentation est aussi plus importante dans ce dernier cas (3.7 fois la proportion de $Lpn_{\text{cultivables}}$ à J0, contre 2 fois pour la vitesse la plus lente). Du fait, probablement, d'un meilleur renouvellement de l'eau du biofilm, la vitesse favorise la multiplication de la forme cultivable de Lpn par rapport aux Lpn_{totales} immédiatement après le transfert des biofilms.

Au deuxième jour du suivi, les proportions de $Lpn_{\text{cultivables}}$ sont équivalentes pour les deux vitesses.

Durant la suite du suivi, la proportion de $Lpn_{\text{cultivables}}$ augmente. Dans le cas de la vitesse la plus faible, cette augmentation présente des paliers (jours 11 à 14 ; 16 à 18). Pour la vitesse la plus importante, l'augmentation est plus rapide, avec une communauté de Lpn presque exclusivement cultivable au 14^{ème} et au 16^{ème} jour. On observe une baisse de la proportion de $Lpn_{\text{cultivables}}$ entre le 16^{ème} et le 18^{ème} jour.

Sur l'ensemble de la période suivie, la vitesse lente engendre une augmentation de la proportion de $Lpn_{\text{cultivables}}$ de 31% par rapport à la valeur à J0. Cette augmentation est plus importante avec la vitesse la plus rapide et atteint 89%. Il semble donc que l'incubation en réacteur tend naturellement à augmenter la proportion de la forme cultivable de Lpn . En outre, cette augmentation est plus importante dans le cas d'une vitesse plus grande. Par contre, ceci n'est pas visible si l'on considère, comme dans le tableau récapitulatif, le rapport entre cette augmentation et la proportion à J0.

Au début de la deuxième expérimentation (**Exp. B**), comme cela était déjà le cas concernant les concentrations de $Lpn_{\text{cultivables}}$, la différence entre les proportions de $Lpn_{\text{cultivables}}$ aux J0 des vitesses testées, est significative. En effet, dans les biofilms utilisés pour la vitesse de 1.05 cm/s, 2.80% des Lpn sont sous leur forme cultivable, tandis que dans les biofilms utilisés pour la vitesse de 13.1 cm/s, 44% des Lpn sont cultivables.

Contrairement à la première expérimentation, l'augmentation de la proportion de $Lpn_{\text{cultivables}}$ qui suit la mise en place dans les réacteurs dure pendant 2 jours quelle que soit la vitesse imposée aux biofilms. L'augmentation représente 4 fois la proportion à J0 dans le cas de la vitesse lente. Pour la vitesse plus rapide, l'augmentation qui est du même ordre de grandeur représente seulement 30% du rapport à J0. La vitesse la plus lente est donc plus favorable à une hausse de la proportion de $Lpn_{\text{cultivables}}$, mais il faut noter que les biofilms utilisés dans ce cas ont une communauté de Lpn beaucoup moins cultivable que celle des biofilms utilisés avec la vitesse plus importante.

A une vitesse de 1.05 cm/s, la tendance à l'augmentation de la proportion de $Lpn_{\text{cultivables}}$ se poursuit jusqu'au 9^{ème} jour où elle atteint 34.6% avant de diminuer et de se stabiliser à partir du 14^{ème} jour.

A une vitesse de 13.1 cm/s, la proportion de $Lpn_{\text{cultivables}}$ est très variable, elle oscille entre une valeur de 20 et de 100% après le deuxième jour. Comme dans la première expérimentation, la rotation la plus rapide permet d'obtenir une communauté de Lpn dans un état presque exclusivement cultivable.

Sur l'ensemble des 18 jours du suivi, le pourcentage de $Lpn_{\text{cultivables}}$ augmente, passant de 3% à 15% soit une différence de 12% à vitesse lente et de 44% à 80% soit une augmentation de 36% à vitesse rapide. Malgré les particularités des évolutions durant cette expérience B (valeurs anormalement fortes de la proportion de Lpn dès le départ de l'incubation à forte vitesse, notamment), le graphique fait apparaître la tendance à une augmentation des valeurs, jusqu'au jour 9 dans le cas de la vitesse lente et sur l'ensemble des 18 jours pour la vitesse rapide. L'augmentation apparaît en outre plus forte dans ce dernier cas que dans le premier sur la base des valeurs indiquées précédemment (Tableau 98).

Ces résultats confirment l'observation effectuée lors de la première expérimentation : la mise en incubation en réacteur a tendance à augmenter la proportion de *Lpn* sous sa forme cultivable, ceci quelle que soit la vitesse de rotation imposée aux biofilms. De plus l'augmentation semble amplifiée par celle de la vitesse.

Au jour 0 de la dernière expérimentation (**Exp. C**), aucune *Lpn* n'était dans un état cultivable. Des formes cultivables apparaissent cependant après le premier jour passé dans les réacteurs.

A vitesse lente la proportion de *Lpn*_{cultivables} augmente au cours des onze premiers jours. Cette augmentation est tout d'abord lente avant de s'intensifier vers les jours 4 et 7. Durant les derniers jours cette proportion varie entre 50 et 90%. Au dernier jour du suivi, 81% des *Lpn* de ces biofilms sont alors cultivables.

Lorsque les biofilms sont soumis à une vitesse rapide, la proportion de *Lpn*_{cultivables} augmente fortement au cours des deux premiers jours avant de baisser de manière importante au 4^{ème} jour. A partir du 7^{ème} jour, elle oscille entre 30 et 62%.

Statistiquement, à partir du 4^{ème} jour, les proportions ne sont pas différentes entre les deux vitesses testées. Au cours de cette période hivernale, une fois passé l'effet immédiat du transfert des biofilms, l'augmentation de la vitesse de rotation n'a donc pas d'effet marqué sur la proportion de la forme cultivable de *Lpn*.

**Tableau 98 : Effet du transfert des biofilms dans les réacteurs et de l'ensemble de l'incubation sur les proportions de *Lpn*_{cultivables} pour chaque vitesse de chaque expérience. (NC : Non Calculable).
(%=(Δ proportion/proportion à J0)*100)**

	1.05 cm/s		13.1 cm/s	
	Δ J0-J1	Δ J0-J18	Δ J0-J1	Δ J0-J18
Exp. A	+13%	+933%	+371%	+812%
Exp. B	+185%	+431%	+4%	+81%
Exp. C	NC	NC	NC	NC

Dans tous les cas, la mise en incubation des biofilms dans les réacteurs se traduit par une augmentation de la proportion de *Lpn*_{cultivables}, quelle que soit la vitesse de rotation. Cette augmentation de l'importance de la forme cultivable peut s'expliquer par un développement intra-amibien, mais également par le changement de la qualité de l'eau par rapport à celle de la bêche de rejet. L'eau de la rivière est probablement plus riche et peut permettre un meilleur développement des *Lpn*_{cultivables}.

Malgré les particularités enregistrées au cours de l'expérience C, l'ensemble des résultats indiquent que la vitesse a pour effet d'accroître la proportion de *Lpn*_{cultivables}. L'absence de différence significative entre les effets des deux vitesses en hiver (expérience C) appuie cette conclusion, la capacité nutritive plus limitée de l'eau à cette saison pouvant en être directement ou indirectement (via les conditions dégradées offertes aux amibes) responsable.

7.4 Cas des flagellés

7.4.1 Suivi de la concentration des flagellés

Pour des raisons techniques, seuls quelques dénombrements de protistes ont pu être effectués au cours de cette série d'expérimentations : ils concernent les concentrations de flagellés durant l'expérimentation B. En outre, une date est manquante dans chacune des deux séries (J11 à 1.05 cm/s et J16 à 13.1 cm/s) (Figure 175).

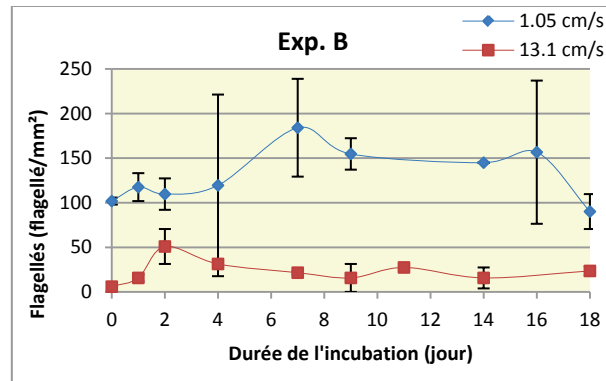


Figure 175 : Evolution de la concentration des flagellés en fonction de la vitesse de l'eau au cours de l'expérience B. Les barres d'erreurs correspondent au MAD.

Comme pour l'ensemble des concentrations bactériennes (celles des Lpn_{totales} font exception), la concentration des flagellés est significativement différente au début des deux suivis avec une valeur à J0 inférieure pour la vitesse la plus rapide : la concentration est effectivement de 6 flagellés/mm² pour la vitesse rapide et de 102 flagellés/mm² pour la vitesse lente.

Quelle que soit la vitesse de rotation imposée, le transfert des biofilms dans les réacteurs se traduit par une augmentation de la concentration des flagellés. Cette augmentation se limite au premier jour suivant le transfert pour la vitesse lente. Elle représente une augmentation de 16 flagellés/mm² soit 15% de la concentration à J0. Pour la vitesse rapide, l'augmentation se poursuit jusqu'au deuxième jour. En plus d'être plus longue, l'augmentation est également plus forte, car à J2, elle représente presque 8 fois la concentration initiale.

Lorsque la rotation des carrousels est lente, la concentration des flagellés augmente à nouveau de 74 flagellés/mm² entre les jours 2 et 7. Elle diminue ensuite jusqu'au dernier jour du suivi. A J18, elle est alors de 90 flagellés/mm², ce qui représente une baisse de 12% de la concentration à J0.

Dans le cas d'une rotation plus rapide, la concentration des flagellés baisse progressivement entre le 2^{ème} et le 9^{ème} jour, et passe ainsi de 51 à 16 flagellés/mm². Sur la période restante, la concentration oscille entre 16 et 27 flagellés/mm² (jours 14 et 11 respectivement), avec une concentration de 23.5 flagellés/mm² au dernier jour du suivi. Sur l'ensemble des 18 jours, la concentration en flagellés se trouve multipliée par 4.

Sur quasiment toute la période suivie, la différence de concentration entre les deux vitesses est significative, avec une valeur supérieure pour la vitesse la plus lente.

Tableau 99 : Effet du transfert des biofilms dans les réacteurs et de l'ensemble de l'incubation sur les concentrations de flagellés pour chaque vitesse de chaque expérience.
(%=(Δ concentration/concentration à J0)*100)

	1.05 cm/s		13.1 cm/s	
	Δ J0-J1	Δ J0-J18	Δ J0-J2	Δ J0-J18
Exp. A	-	-	-	-
Exp. B	+15%	-12%	+767%	+300%
Exp. C	-	-	-	-

Comme trouvé à plusieurs reprises précédemment pour les autres composantes microbiennes des biofilms, une augmentation de la concentration des flagellés est constatée du simple fait du changement de milieu des biofilms mais aussi de l'augmentation de la vitesse.

Ce résultat est surprenant car les flagellés, à l'image de l'ensemble des protistes, se situent principalement dans l'eau interstitielle (Parry, 2004), et leur contact avec les EPS est moins intime que celui des bactéries ils sont donc plus susceptibles d'être entraînés dans le flux de renouvellement de l'eau.

Le résultat suggère donc, comme l'ont montré Wey *et al.* (2008), une action indirecte de la vitesse sur leurs concentrations à travers l'augmentation de la concentration de leurs proies, elle-même liée à l'effet positif des flux d'eau circulante sur les bactéries.

7.5 Effet de la vitesse sur les corrélations entre descripteurs bactériens

Au cours de ce paragraphe nous cherchons à mettre en évidence des corrélations (ou au minimum des tendances) entre les différents descripteurs bactériens suivis. En raison des différences de composition des biofilms utilisés au cours de chaque essai, il a été nécessaire de considérer séparément chaque expérimentation ainsi que chacune des deux vitesses testées.

7.5.1 Relations entre les concentrations en bactéries *totales* et en bactéries *cultivables*

En considérant tout d'abord l'ensemble de la communauté bactérienne, on note qu'à l'exception de l'expérience A, la concentration des formes cultivables a tendance à varier dans le même sens que la concentration des bactéries *totales* (Figure 176).

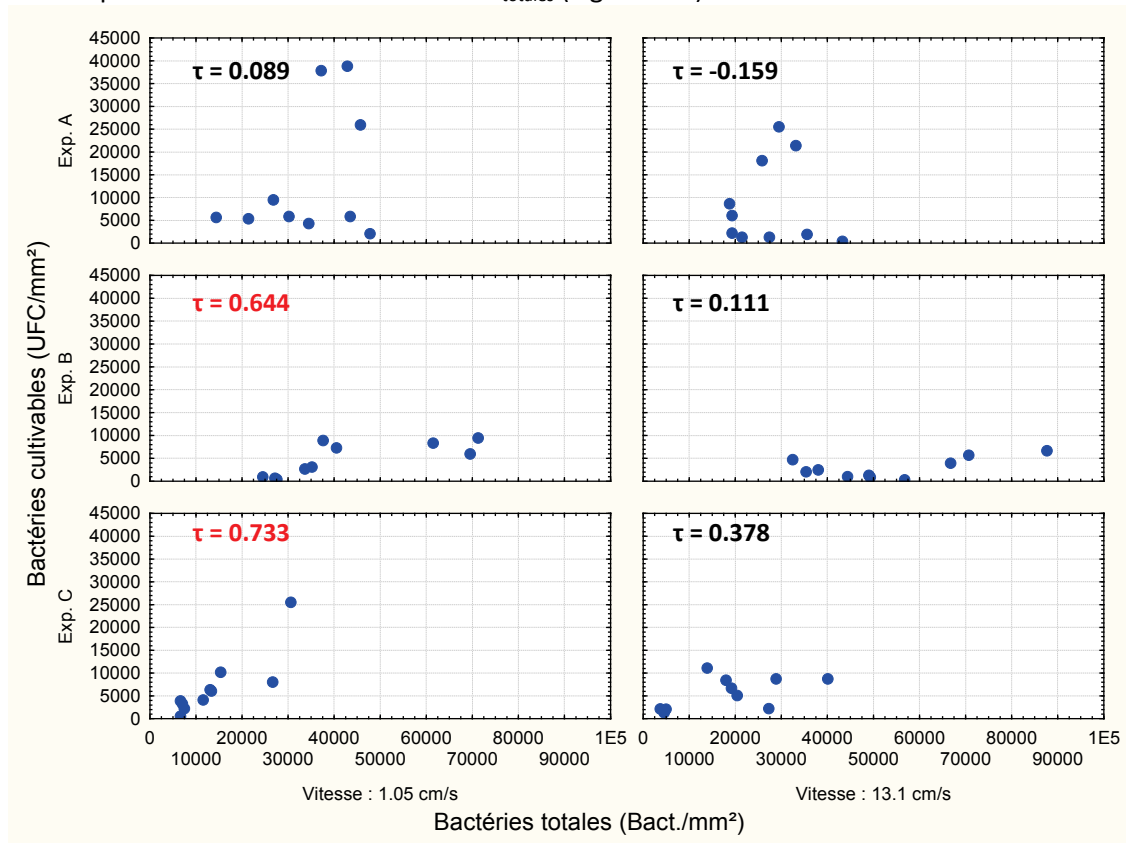


Figure 176 : Evolution des concentrations en bactéries *cultivables* en fonction des concentrations en bactéries *totales* selon la vitesse de l'eau pour chaque expérimentation (n=10). Le τ est le coefficient de corrélation de Kendall, il est en rouge lorsqu'il est significatif (p≤0.05).

Lorsque la vitesse est lente, cette tendance devient une corrélation significative dans le cas des expériences B et C. Tandis que pour la vitesse la plus rapide, il s'agit uniquement d'une tendance pour l'expérience C. L'expérience B est particulière : pour une concentration inférieure à 6×10^4 bact/mm², la tendance est négative tandis que pour une concentration supérieure, cette tendance devient positive.

L'augmentation de la vitesse de rotation semble donc influencer le rapport existant entre les formes cultivables et l'ensemble de la communauté bactérienne.

L'effet « contrainte » (érosion liée aux forces de cisaillement) de l'action de la vitesse semble donc devenir prépondérant vis-à-vis de son effet « bénéfique » lorsqu'elle augmente.

7.5.2 Relations entre les concentrations de Lpn_{totales} et de bactéries_{totales} (Figure 177).

Seule l'expérience effectuée en période estivale (Exp. B) met en évidence une corrélation entre ces deux descripteurs. Il s'agit d'une corrélation positive quasi-linéaire, où les concentrations de Lpn_{totales} varient dans le même sens que la concentration des bactéries_{totales}.

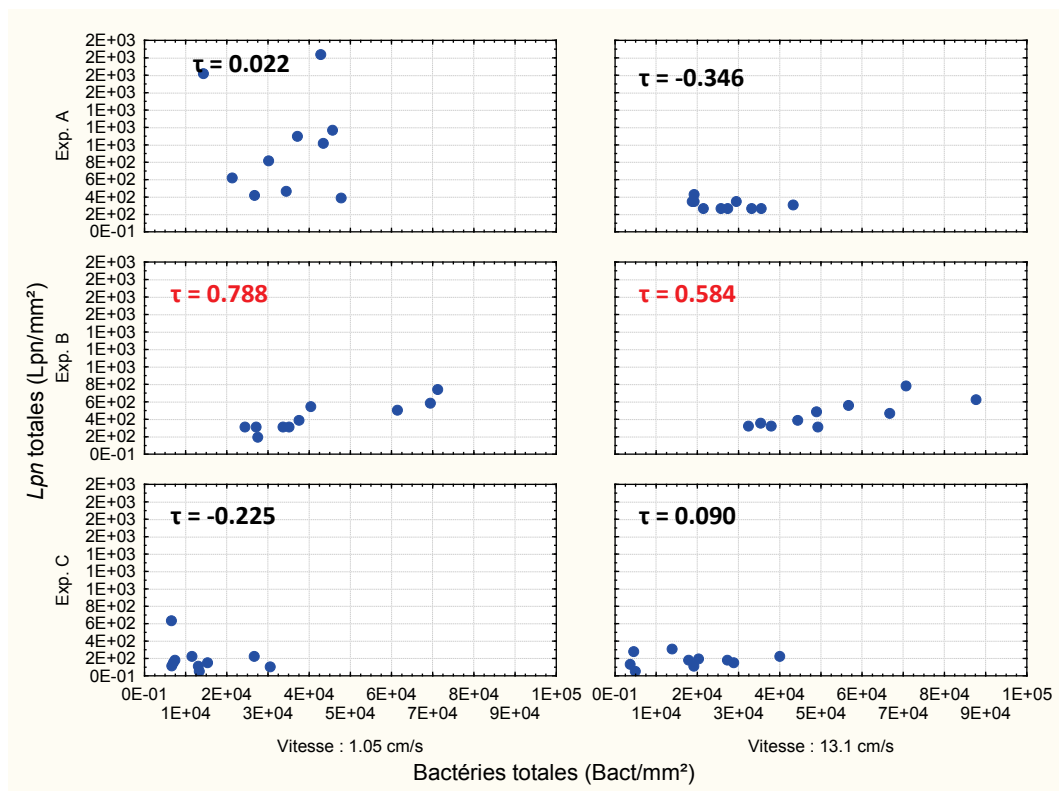


Figure 177 : Evolution des concentrations en Lpn_{totales} en fonction des concentrations en bactéries_{totales} selon la vitesse de l'eau pour chaque expérimentation ($n=10$). Le τ est le coefficient de corrélation de Kendall, il est en rouge lorsqu'il est significatif ($p \leq 0.05$).

En période printanière (Exp. A), la vitesse modifie la tendance entre ces deux descripteurs. En effet, à vitesse lente, une tendance positive s'observe sur une majorité des points, tandis qu'à vitesse rapide, la tendance est moins marquée et semble négative.

En hiver (Exp. C), aucune tendance n'a pu être observée quelle que soit la vitesse testée. Le facteur saisonnier est donc plus important que le facteur vitesse sur les relations entre ces deux descripteurs. A cette saison, il se peut que la température ou la capacité nutritive de l'eau ait plus d'impact sur les variations de concentrations de Lpn_{totales} que sur celles des concentrations des bactéries_{totales}.

Les relations entre les concentrations de Lpn_{totales} et les concentrations de bactéries_{totales} sont donc influencées à la fois par la vitesse de l'eau et par la saison à laquelle sont effectués les suivis. La relation positive reste la plus souvent rencontrée.

7.5.3 Relations entre les concentrations de $Lpn_{\text{cultivables}}$ et les concentrations des bactéries_{totales}

Une seule corrélation significative est obtenue entre ces deux descripteurs (Figure 178).

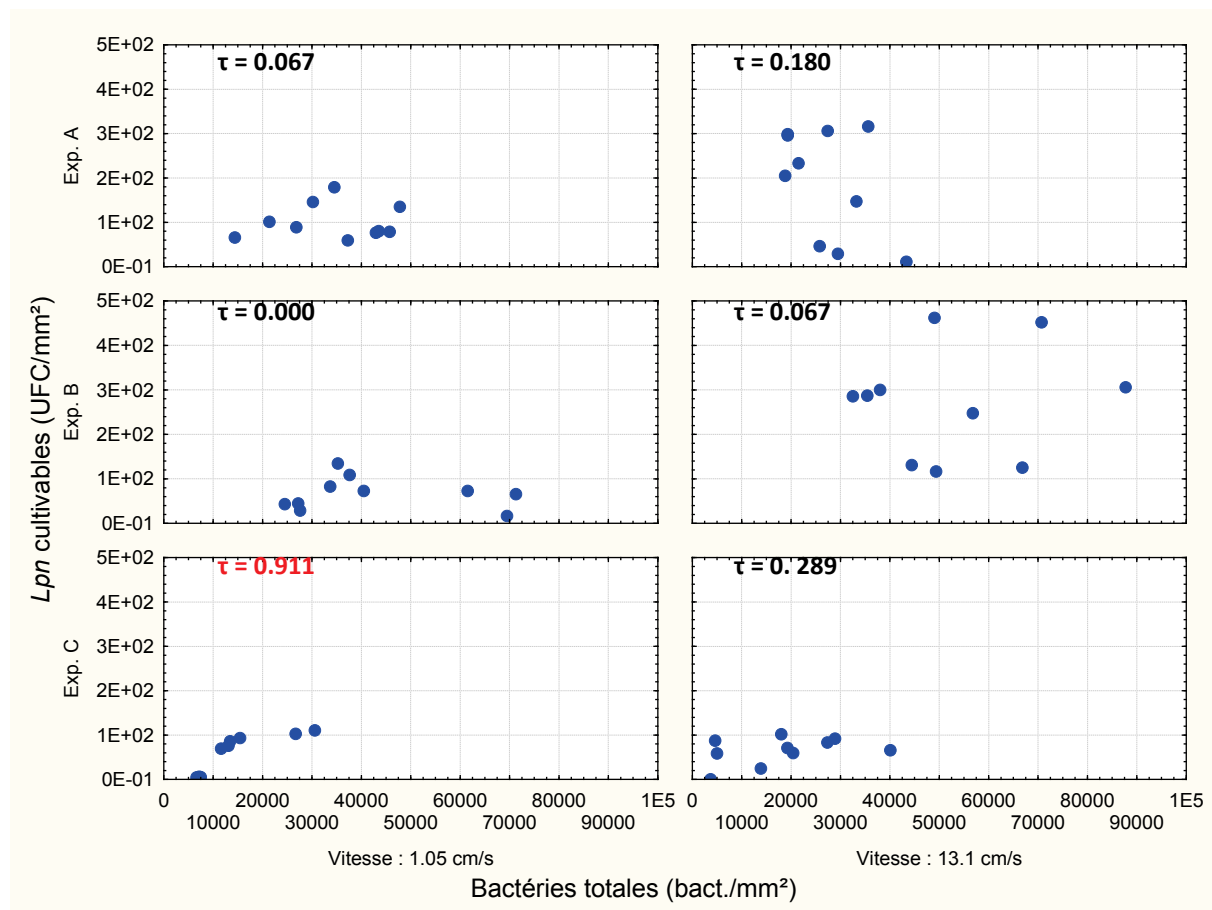


Figure 178 : Evolution des concentrations en $Lpn_{\text{cultivables}}$ en fonction des concentrations en bactéries_{totales} selon la vitesse de l'eau pour chaque expérimentation (n=10). Le τ est le coefficient de corrélation de Kendall, il est en rouge lorsqu'il est significatif ($p \leq 0.05$).

Cette corrélation positive entre les concentrations de $Lpn_{\text{cultivables}}$ et des bactéries_{totales} est observée en période hivernale (Exp. C) dans le cas de la vitesse la plus lente. Ce résultat montre que la forme cultivable de Lpn n'est plus détectable lorsque la concentration de bactéries_{totales} est inférieure à 1×10^4 bact./mm². Au-delà, la concentration de $Lpn_{\text{cultivables}}$ augmente avec l'augmentation de la concentration des bactéries_{totales}. Dans ces conditions, la concentration de $Lpn_{\text{cultivables}}$ ne semble pas pouvoir dépasser la valeur de 100 UFC/mm². Une carence nutritive de l'eau alimentant les réacteurs peut être une nouvelle fois responsable de cette limite, car une concentration supérieure de $Lpn_{\text{cultivables}}$ a été observée au cours des autres essais.

La vitesse de l'eau a un effet plus important sur les concentrations des bactéries_{totales} et des $Lpn_{\text{cultivables}}$ que sur les relations entre ces deux descripteurs. Comme souvent la saison a également une influence dans ces relations, à l'exemple de la corrélation trouvée entre ces deux descripteurs uniquement pour la période hivernale (dans le cas de la rotation lente).

7.5.4 Relations entre les concentrations de Lpn_{totales} et celles des bactéries_{cultivables}

En plus de leurs corrélations avec les concentrations de bactéries_{totales}, les concentrations de Lpn_{totales} peuvent également être corrélées positivement avec les concentrations des bactéries_{cultivables} (Figure 179).

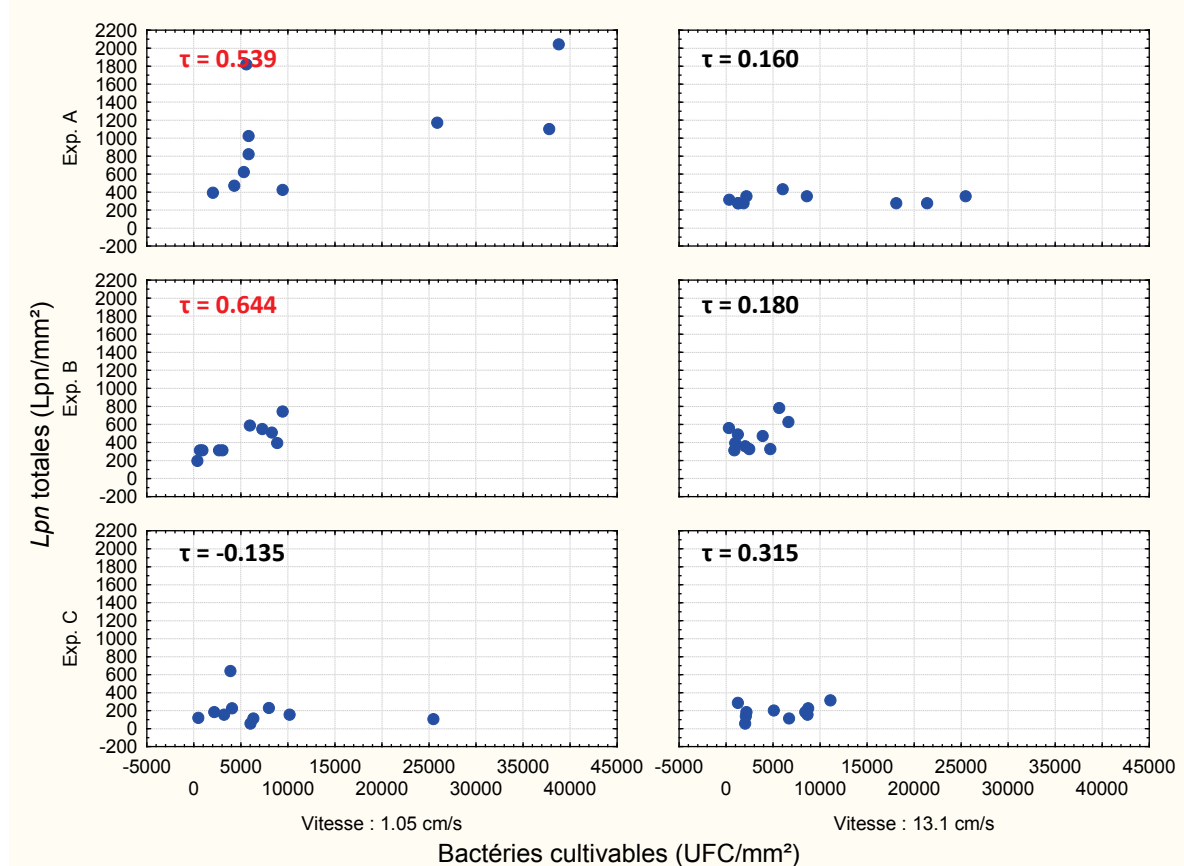


Figure 179 : Evolution des concentrations en Lpn_{totales} en fonction des concentrations en bactéries_{cultivables} selon la vitesse de l'eau pour chaque expérimentation (n=10). Le τ est le coefficient de corrélation de Kendall, il est en rouge lorsqu'il est significatif ($p \leq 0.05$).

Cette corrélation n'est significative que pour la vitesse la plus lente, sauf en période hivernale. Sur ces mêmes périodes printanière et estivale, la vitesse est responsable de la disparition de cette corrélation. En hiver, seule la vitesse la plus élevée montre une légère tendance positive entre ces deux descripteurs.

Dans la majorité des suivis effectués, les concentrations de Lpn_{totales} et de bactéries_{cultivables} varient dans le même sens. Dans nos réacteurs, les conditions favorables au développement de la communauté bactérienne cultivable permettent également la multiplication de Lpn_{totales} .

7.5.5 Analyse des corrélations potentielles entre les concentrations de $Lpn_{\text{cultivables}}$ et de bactéries_{cultivables} (Figure 180).

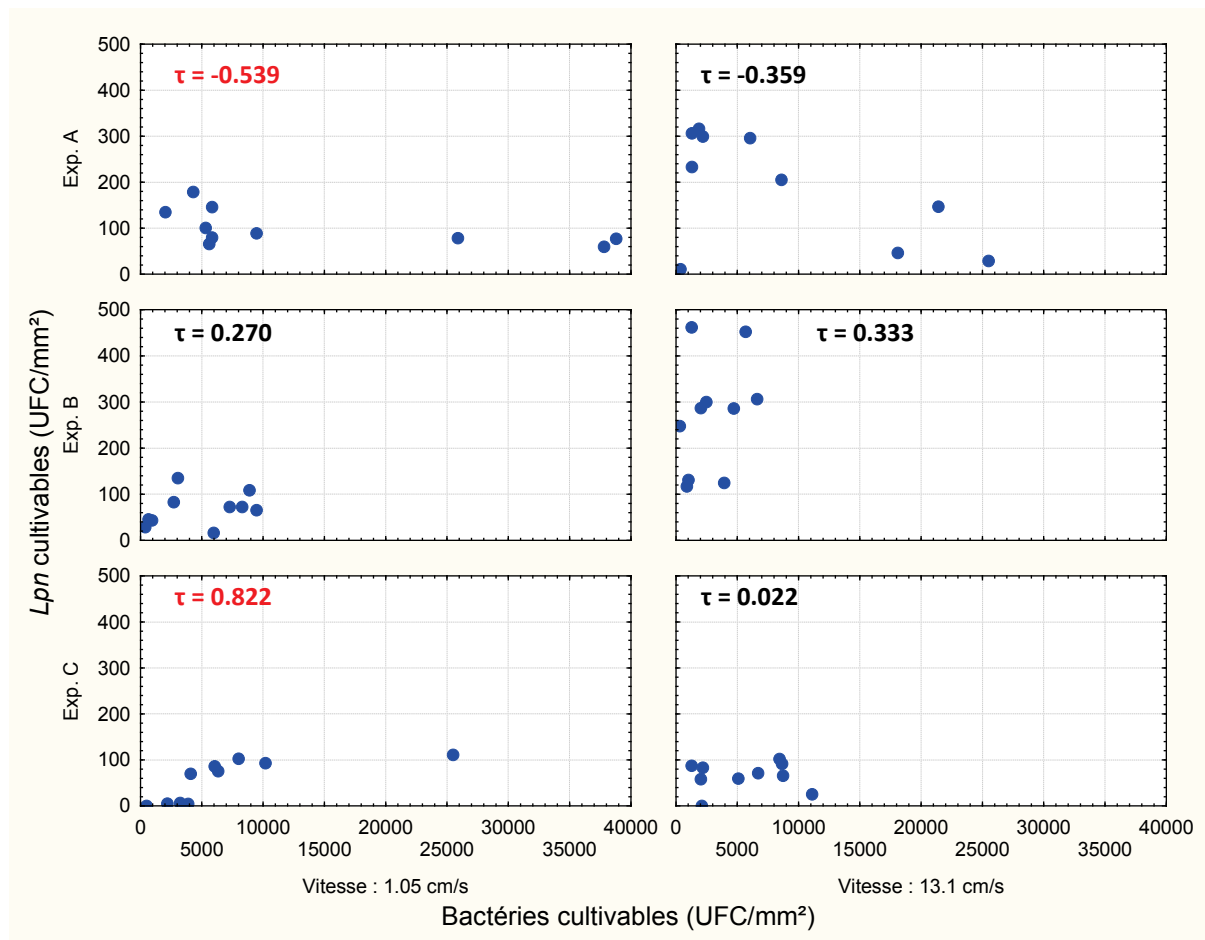


Figure 180 : Evolution des concentrations en $Lpn_{\text{cultivables}}$ en fonction des concentrations en bactéries_{cultivables} selon la vitesse de l'eau pour chaque expérimentation (n=10). Le τ est le coefficient de corrélation de Kendall, il est en rouge lorsqu'il est significatif ($p \leq 0.05$).

La première expérimentation, en période printanière, met en évidence l'existence d'une corrélation négative entre ces deux concentrations dans le cas de la vitesse lente. L'augmentation de la vitesse est responsable de la disparition de cette corrélation négative, mais une tendance négative reste tout de même observable. Dans un contexte où l'eau est assez riche en nutriments, l'augmentation de la concentration des bactéries_{cultivables} augmente le risque que la communauté bactérienne abrite une ou plusieurs espèces inhibitrices de la forme cultivable de *Lpn*, expliquant alors cette corrélation. Il est également possible que la multiplication des bactéries_{cultivables} entraîne un appauvrissement du milieu qui empêche alors aux *Lpn* de se maintenir sous leur forme cultivable.

En été, aucune tendance ni corrélation n'est visible quelle que soit la vitesse de rotation.

En hiver (Exp.C), seule la vitesse lente met en évidence une corrélation entre ces deux descripteurs. Mais, contrairement aux observations effectuées en période estivale, il s'agit ici d'une corrélation positive. La concentration de *Lpn*_{cultivables} en fonction de la concentration des bactéries_{cultivables} est représentée par une courbe en S, avec une tendance positive entre 3×10^4 et 5×10^4 UFC_{bactéries}/mm² et une concentration en *Lpn*_{cultivables} maximale de 100 UFC_{Lpn}/mm² atteinte pour une concentration en bactéries_{cultivables} de 8×10^3 UFC/mm².

La vitesse peut donc influencer les relations entre les *Lpn*_{cultivables} et les autres bactéries_{cultivables}, mais elle ne semble pas être le facteur principal de cette relation. La température ou la quantité de nutriments présents dans l'eau semble plus importante.

7.5.6 Relations entre proportion de *Lpn*_{cultivables} et la concentration des bactéries_{totales}

Les relations entre la proportion de *Lpn*_{cultivables} et la concentration des bactéries_{totales} sont plus fréquentes et varient généralement en fonction de la vitesse de rotation des biofilms (Figure 181).

En effet, lors de la première expérimentation, à vitesse lente, la proportion de *Lpn*_{cultivables} augmente simultanément à la concentration des bactéries_{totales}. Ceci n'est valable que jusqu'à une concentration bactérienne de 3.5×10^4 bact/mm². Par contre, à vitesse rapide, à l'exception de deux points, on observe une tendance négative entre ces deux descripteurs.

L'expérience effectuée en été (Exp. B) montre une influence de la vitesse moins marquée que précédemment. La vitesse lente est en correspondance avec une augmentation de la proportion de *Lpn*_{cultivables} jusqu'au même seuil de 3.5×10^4 bact/mm². Puis la proportion de *Lpn*_{cultivables} diminue pour les concentrations bactériennes supérieures à ce seuil. Dans le cas de la vitesse supérieure, la proportion de *Lpn*_{cultivables} a tendance à diminuer lors de l'augmentation de la concentration des bactéries_{totales}.

La dernière expérimentation, effectuée en période hivernale, met en évidence une corrélation positive entre ces descripteurs pour la vitesse la plus lente. Cette corrélation disparaît dans le cas de la vitesse la plus rapide.

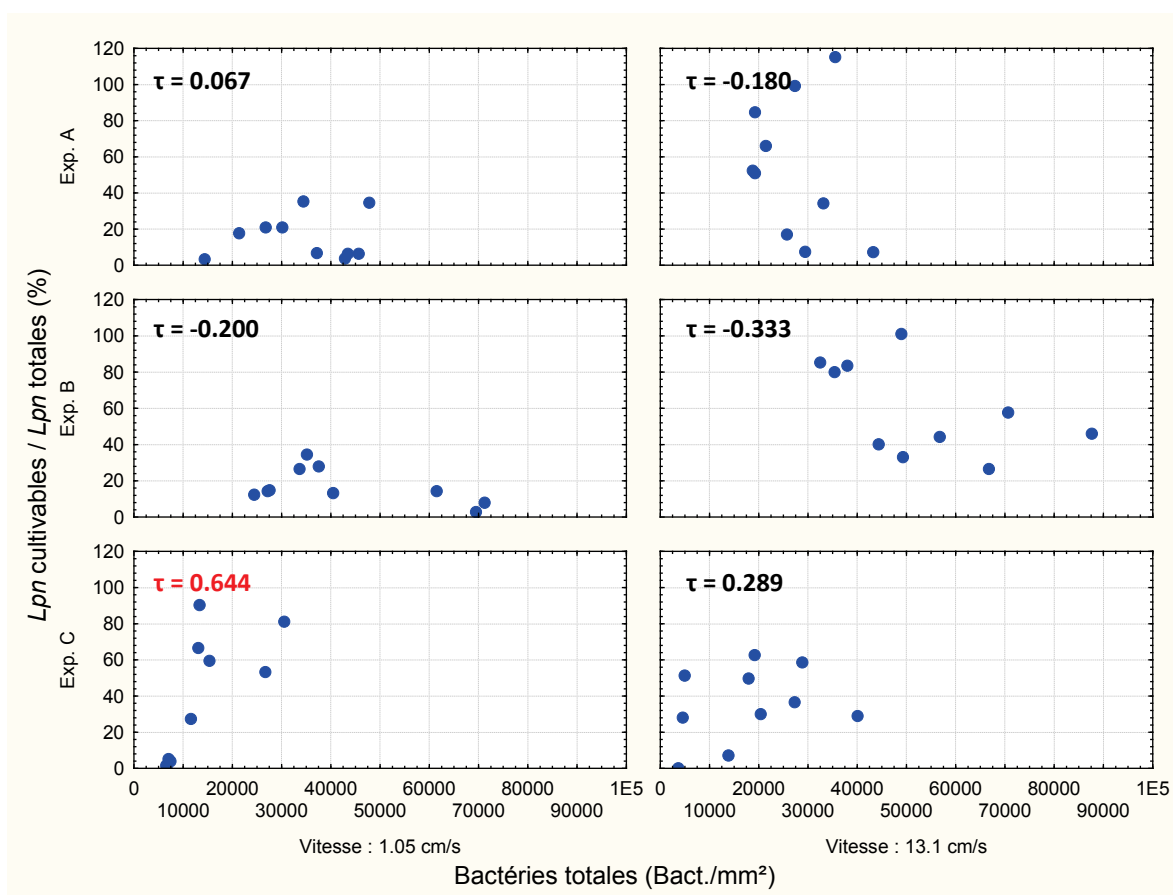


Figure 181 : Evolution des proportions de *Lpn_cultivables* en fonction des concentrations en bactéries_{totales} selon la vitesse de l'eau pour chaque expérimentation (n=10). Le τ est le coefficient de corrélation de Kendall, il est en rouge lorsqu'il est significatif ($p \leq 0.05$).

Ces résultats montrent qu'à faible vitesse, la proportion de *Lpn_cultivables* augmente simultanément à la concentration des bactéries_{totales}. Tandis qu'à une vitesse plus importante, cette relation a tendance à s'inverser dans les cas des expériences A et B : plus la concentration des bactéries_{totales} est faible, plus la proportion de *Lpn_cultivables* est grande.

7.5.7 Recherche de corrélations impliquant les concentrations des flagellés

À vitesse rapide (13.1 cm/s), il existe une tendance plutôt forte (corrélation positive mais non significative), entre la variation des concentrations des flagellés, d'une part, et, d'autre part, celles des concentrations des bactéries_{cultivables} ou des proportions des bactéries_{cultivables}. Ces tendances ne sont pas visibles dans le cas de la vitesse lente (1.05 cm/s ; Figure 182). Il est donc possible que l'augmentation de la vitesse favorise l'influence des flagellés sur les concentrations et les proportions des bactéries_{cultivables}, peut être en augmentant la probabilité de rencontre entre la proie (les bactéries cultivables) et le prédateur (les flagellés), ou encore en rendant les conditions plus favorables à la fois pour la forme cultivable des bactéries du biofilm mais aussi pour les flagellés.

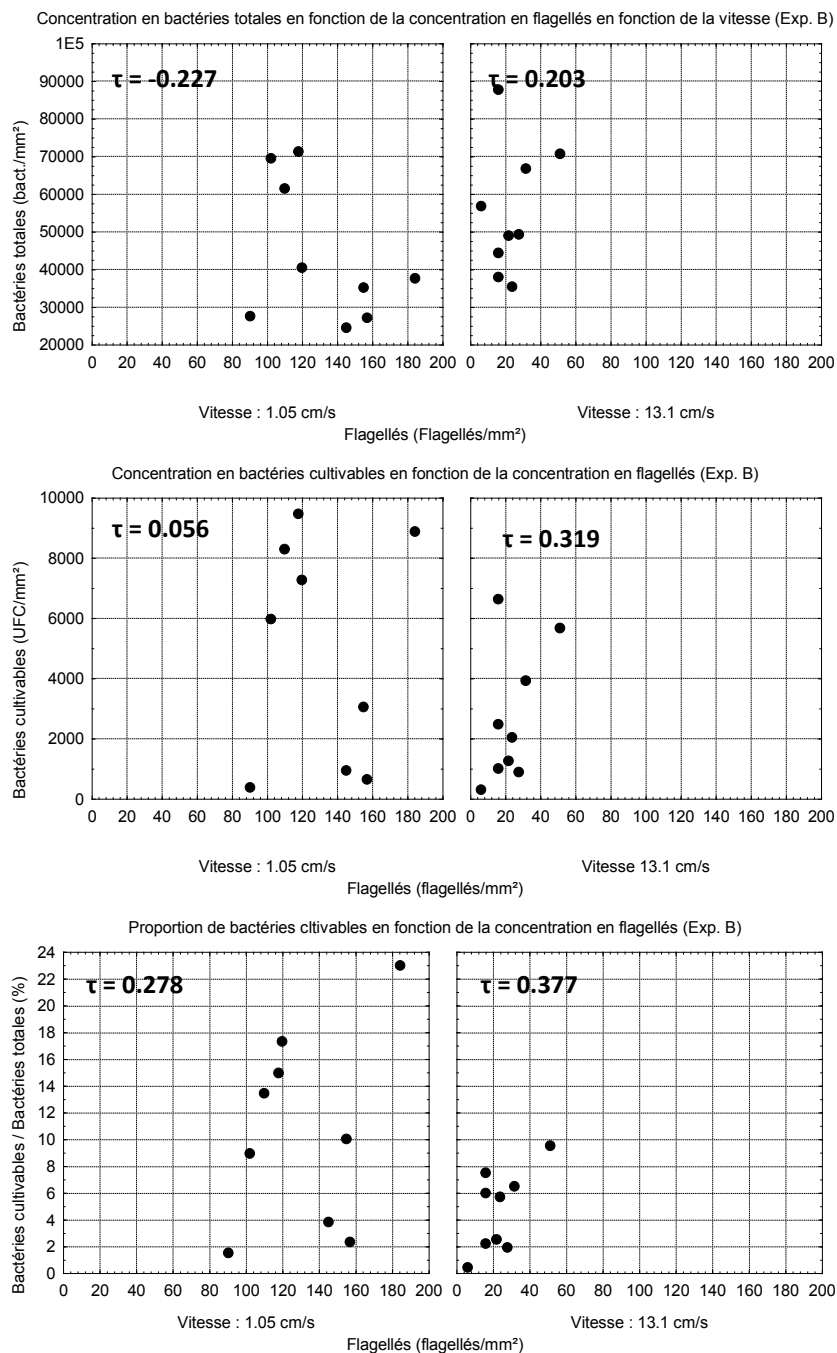


Figure 182 : Evolution des concentrations et des proportions en bactéries dans leurs différents états physiologiques en fonction de la concentration en flagellés lors de l'expérience B (n=9). Le τ est le coefficient de corrélation de Kendall, il est en rouge lorsqu'il est significatif ($p \leq 0.05$).

Il n'existe, par contre, aucune tendance entre les concentrations des flagellés et les concentrations des bactéries_{totales}. Cette observation peut être liée à la variation d'appétence des bactéries en fonction de leur état physiologique, particularité qui parmi d'autres, distingue les formes cultivables des bactéries vis-à-vis de celles qui ne le sont pas. Comme pour l'ensemble de la communauté bactérienne, il n'est pas possible de distinguer une tendance nette entre la concentration des flagellés et les Lpn_{totales} (en concentration et proportion), ceci quelque soit la vitesse considérée (Figure 183 et Figure 184). Par contre, une tendance positive est observable entre la concentration des flagellés d'une part, et d'autre part, la concentration et la proportion de $Lpn_{\text{cultivables}}$ pour la vitesse la plus lente (Figure 183 et Figure 184).

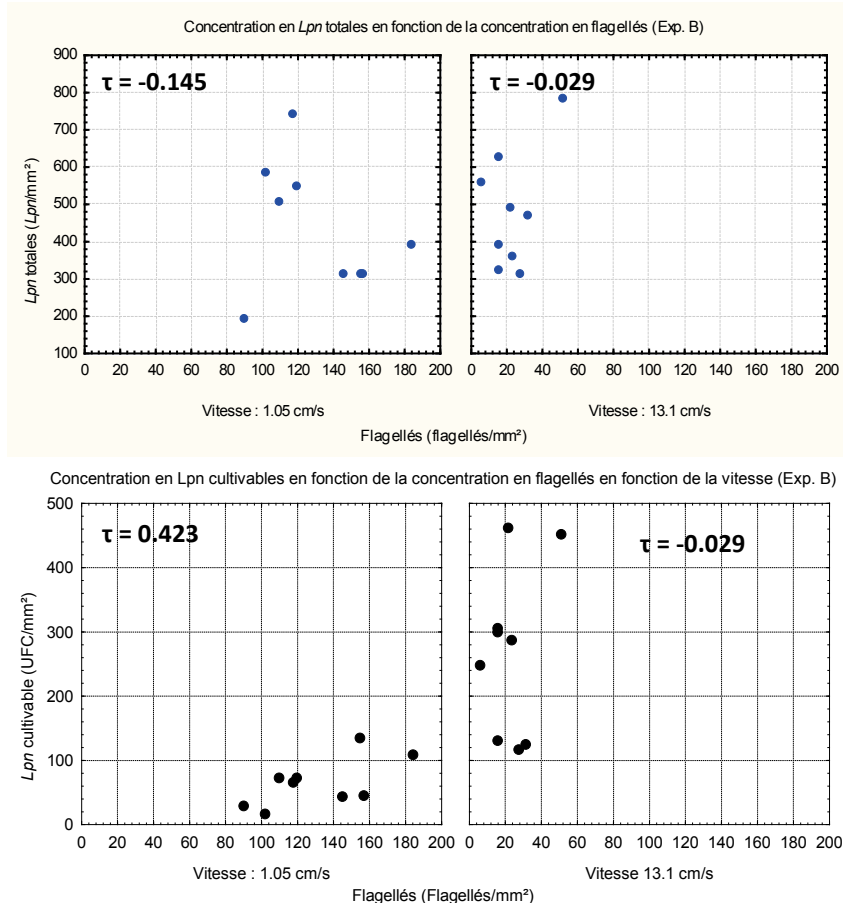


Figure 183 : Evolution des concentrations en Lpn totales ou cultivables en fonction de la concentration en flagellés selon la vitesse de l'eau au cours de l'expérience B (n=9). Le τ est le coefficient de corrélation de Kendall, il est en rouge lorsqu'il est significatif ($p \leq 0.05$).

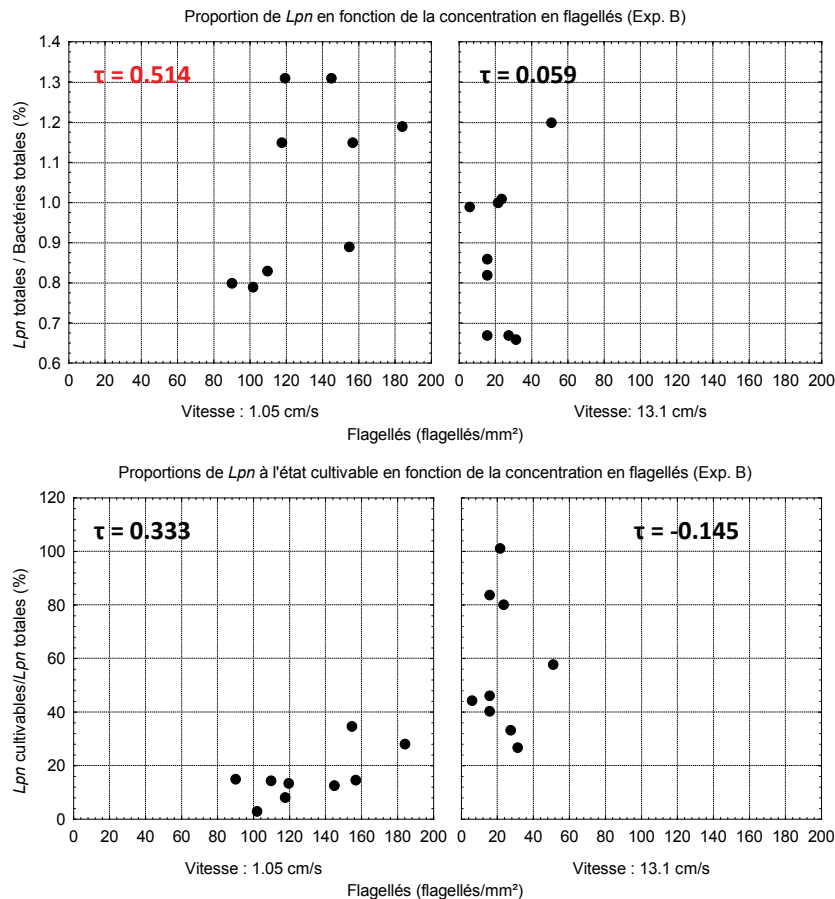


Figure 184 : Evolution de la proportion en *Lpn* totales ou cultivables en fonction de la concentration des flagellés selon la vitesse au cours de l'expérience B (n=9). Le τ est le coefficient de corrélation de Kendall, il est en rouge lorsqu'il est significatif ($p \leq 0.05$).

Nos résultats mettent en évidence une relation positive entre les flagellés, d'une part et d'autre part, les bactéries_{cultivables} et *Lpn*_{cultivables}. Ils font également apparaître l'absence de corrélation avec les concentrations des bactéries_{totales}, et *Lpn*_{totales}.

Il est évident par ailleurs que l'augmentation de la concentration de flagellés augmente la pression de prédation sur les communautés bactériennes, avec pour conséquence une levée des processus d'auto-inhibition au sein de ces communautés bactériennes en liaison avec le caractère limitant de la ressource trophique. Cette remarque laisse supposer qu'une relation plutôt négative s'établisse entre flagellés et bactéries_{totales}. Si maintenant, on retient le fait que, dans ces conditions de forte prédation, les cellules restantes sont métaboliquement plus actives (Johannes, 1965) et si un lien existe entre l'état physiologique des bactéries et leurs formes cultivables, ces dernières devraient prendre une importance relative plus grande dans les communautés bactériennes lorsque la concentration des prédateurs augmente.

Ce résultat est précisément celui que nous avons obtenu avec une relation positive entre flagellés et proportion des formes cultivables des bactéries et plus spécifiquement de *Lpn*.

Il est cependant possible que d'autres facteurs dépendants de la vitesse de l'eau tels que la concentration en O₂, favorisent à la fois les bactéries_{cultivables} et les protistes au sens large. Si les amibes bénéficient elles aussi de ces conditions, les *Lpn*_{cultivables} seraient elles aussi indirectement favorisées du fait de la multiplication intra-cellulaire.

7.6 Conclusions concernant l'effet de la vitesse sur la composition des biofilms

Rappelons ici que les expériences précédentes avaient pour objectif d'étudier les effets de la vitesse du cours d'eau sur les biofilms qui se forment à partir des fragments de biofilms issus de la bêche depuis laquelle se font une partie des rejets des thermes. A la suite de ce transfert, les conditions de l'environnement des bactéries changent en effet de façon radicale.

La vitesse du cours d'eau a un effet non négligeable sur l'évolution des biofilms. Il ne s'agit toutefois pas du seul facteur influençant leur évolution. La saison, à travers la température et les concentrations en nutriments, tout comme la composition initiale des biofilms, sont également des facteurs à prendre en compte. Lorsque la vitesse augmente, le facteur « saison » intervient sur l'équilibre entre le stress lié aux forces de cisaillement et le bénéfice apporté par le renouvellement des nutriments.

Des deux vitesses testées, la plus importante est plutôt favorable à la communauté bactérienne du biofilm (bactéries_{totales} et bactéries_{cultivables}). L'étude de la proportion des bactéries_{cultivables} montre que ces dernières sont plus influencées par la vitesse de l'eau que les bactéries_{totales}.

Quelle que soit la saison, la concentration de Lpn_{totales} a tendance à diminuer au cours du suivi. Mais cette perte de Lpn est moins importante pour la vitesse supérieure. Contrairement aux réseaux d'eaux chaudes sanitaires où Lpn se multiplie dans les bras morts, la vitesse favorise ici le maintien de Lpn_{totales} mais également de leur forme cultivable. Comme pour l'ensemble des bactéries, on remarque que la proportion de $Lpn_{\text{cultivables}}$ est plus sensible aux variations de vitesse que la concentration de Lpn_{totales} . Concernant les concentrations de $Lpn_{\text{cultivables}}$, l'effet de la vitesse de l'eau dépend généralement de leur concentration à J0. D'une manière générale, pour les deux vitesses testées et contrairement à ce que l'on a observé avec Lpn_{totales} , l'incubation en réacteur favorise leur présence.

L'augmentation de la vitesse est également responsable de changements dans les relations entre les différentes formes de Lpn et la communauté bactérienne. Ces changements dépendent aussi de la saison ainsi que de la composition des biofilms au début de chaque suivi. Les corrélations obtenues dans le cadre de cette étude sont donc difficilement généralisables.

Les flagellés, seuls protistes dénombrés dans cette étude, semble également favorisés par les vitesses plus importantes. Mais ce résultat ne repose que sur une seule expérimentation et devra donc être vérifié, mais ce résultat est en accord avec ceux de Hunt & Parry (1998) lors des 25 premiers jours de développement du biofilm.

Il est nécessaire de rester prudent quant aux conclusions obtenues au cours de ces premiers essais. Les suivis qui les compléteront devront être effectués si possible simultanément pour les deux vitesses, en alimentant les réacteurs avec de l'eau de la Chaudanne (et non avec l'eau de la Leysse) qui est le milieu récepteur des eaux thermales aixoises. L'évolution de la composition de la communauté bactérienne pourrait également être décrite avec plus de précisions. Enfin, une étude plus précise des protistes du biofilm permettrait de tester l'hypothèse du développement intra-amibien des Lpn comme mécanisme de protection face au stress provoqué par l'augmentation des forces de cisaillement.

Tableau 100 : p-values données par le test de Mann Whitney appliqué à la comparaison des concentrations aux 2 vitesses, des descripteurs suivants : bactéries_{totales}, bactéries_{cultivables}, *Lpn*_{totales}, *Lpn*_{cultivables}, flagellés, proportions des bactéries_{cultivables}, des *Lpn*_{totales} et des *Lpn*_{cultivables}. Le calcul a été fait pour chaque jour et pour chacune des 3 expériences. La différence est significative pour $p \leq 0.05$ (valeur en rouge et en gras). Il est à noter que des différences significatives apparaissent entre les concentrations des descripteurs au jour 0, avant même, donc, tout effet de la vitesse. En conséquence, les différences significatives qui apparaissent pour les jours suivants ne peuvent pas être clairement attribuées à un effet vitesse. Ces résultats doivent être interprétés en association avec les représentations graphiques.

Jour	Bactéries totales			Bactéries cultivables			Lpn totales			Lpn cultivables			Flagellés		
	Exp. A	Exp. B	Exp. C	Exp. A	Exp. B	Exp. C	Exp. A	Exp. B	Exp. C	Exp. A	Exp. B	Exp. C	Exp. A	Exp. B	Exp. C
0	0.127	0.050	0.050	0.050	0.050	0.050	0.050	0.383	0.827	0.127	0.050	1.000	-	0.050	-
1	0.827	0.050	0.050	0.275	0.050	0.050	0.050	0.050	0.275	0.827	0.050	0.050	-	0.050	-
2	0.827	0.275	0.050	0.513	0.050	0.827	0.050	0.050	0.383	0.275	0.513	0.050	-	0.513	-
4	0.050	0.050	0.050	0.127	0.513	0.050	0.050	0.275	0.050	0.827	0.513	0.050	-	0.513	-
7	0.513	0.050	0.050	0.275	0.050	0.513	0.127	0.127	0.827	0.050	0.275	0.127	-	0.050	-
9	0.127	0.050	0.050	0.827	0.050	0.275	0.050	0.190	0.050	0.127	0.827	0.827	-	0.050	-
11	0.127	0.050	0.050	0.050	0.513	0.275	0.050	1.000	0.275	0.050	0.827	0.827	-	1.000	-
14	0.050	0.050	0.050	0.050	0.190	0.050	0.127	0.827	0.127	0.050	0.050	0.827	-	0.050	-
16	0.275	0.127	0.513	0.050	0.050	0.827	0.081	0.050	0.827	0.127	0.050	0.827	-	0.050	-
18	0.127	0.050	0.050	0.127	0.050	0.275	0.081	0.050	0.513	0.127	0.050	0.513	-	0.050	-

Jour	Proportions de Bactéries cultivables			Proportion de <i>Lpn</i> totales			Proportion de <i>Lpn</i> cultivables		
	Exp. A	Exp. B	Exp. C	Exp. A	Exp. B	Exp. C	Exp. A	Exp. B	Exp. C
0	0.050	0.050	0.050	0.050	0.663	0.190	0.127	0.050	1.000
1	0.050	0.050	0.275	0.050	0.050	0.050	0.050	0.050	0.050
2	0.050	0.050	0.275	0.050	0.513	0.663	0.513	0.513	0.050
4	0.275	0.050	0.050	0.050	0.050	0.383	0.127	0.513	0.127
7	0.827	0.050	0.827	0.513	0.050	0.050	0.050	0.275	0.275
9	0.513	0.050	0.050	0.275	0.275	0.275	0.050	0.827	0.513
11	0.513	0.275	0.127	0.050	0.050	0.827	0.050	0.827	0.513
14	0.050	0.513	0.050	0.050	0.050	0.050	0.050	0.050	0.513
16	0.275	0.050	0.513	0.050	0.827	0.513	0.050	0.050	0.827
18	0.513	0.050	0.127	0.513	0.081	0.513	0.050	0.050	0.275

Tableau 101 : p-values données par le test de Mann Whitney appliqué à la comparaison des concentrations entre les jours J0 et J18, des descripteurs suivants : bactéries_{totales}, bactéries_{cultivables}, *Lpn*_{totales}, *Lpn*_{cultivables}, flagellés, proportions des bactéries_{cultivables}, des *Lpn*_{totales} et des *Lpn*_{cultivables}. Le calcul a été fait pour chaque expérience et pour chacune des 2 vitesses. La différence est significative pour $p \leq 0.05$ (valeur en rouge et en gras).

	Exp A		Exp B		Exp C	
	1.05 cm/s	13.1 cm/s	1.05 cm/s	13.1 cm/s	1.05 cm/s	13.1 cm/s
Bactéries totales	0.127	0.050	0.050	0.050	0.050	0.050
Bactéries cultivables	0.513	0.050	0.050	0.050	0.050	0.050
<i>Lpn</i> totales	0.190	1.000	0.050	0.050	0.827	0.050
<i>Lpn</i> cultivables	0.275	0.050	0.050	0.275	0.050	0.050
Flagellés	-	-	0.050	0.050	-	-
Proportions de bactéries cultivables	0.127	0.050	0.050	0.050	0.050	0.050
Proportions de <i>Lpn</i> totales	0.050	0.190	0.827	0.513	0.050	0.050
Proportions de <i>Lpn</i> cultivables	0.050	0.050	0.046	0.127	0.050	0.050

8 Effet des changements de la température de l'eau sur la présence de L. pneumophila dans un biofilm : Etude expérimentale.

Cette étude a pour objectif d'évaluer l'influence de la température de l'eau du cours d'eau récepteur sur les biofilms contaminés en légionelles qu'il reçoit en provenance de l'établissement thermal (bâche). De cette influence dépend, en effet, la réinstallation de ces fragments de biofilms sur les supports du milieu récepteur, la survie des légionelles et leur dissémination vers l'aval dans le réseau hydrographique.

Cette étude met en œuvre les réacteurs biologiques décrits précédemment (Chapitre 3.3 et 3.3.2), alimentés par l'eau de la Chaudanne avec ou sans préchauffage, pour le banc "rivière réchauffée" et pour le banc "rivière" respectivement. Les biofilms placés dans les réacteurs, sont âgés de 7 jours et proviennent de la bâche de rejet de l'établissement thermal Chevalley ($T=35^{\circ}\text{C}$). Leur évolution au sein des réacteurs est ensuite suivie pendant 20 jours.

Trois augmentations de température du milieu récepteur ont été testées (Tableau 102). Les températures caractérisant chaque essai ont été déterminées comme les valeurs modales des données enregistrées toutes les 15 minutes dans chacun des réacteurs tout au long des 20 jours du suivi.

Au cours du suivi, les variations de températures observées dans les réacteurs "Rivière" proviennent des fluctuations journalières de l'eau de la rivière, tandis que celles, plus importantes, observées dans le banc "Rivière réchauffée" proviennent essentiellement de mises en défaut occasionnelles de l'automate qui gère ces réacteurs. Ces défauts ont généralement pour origine un problème de remplissage de la cuve de chauffe. Un dépôt important de calcaire colmate les tubes et engendre alors un dysfonctionnement des pompes. Au cours de l'expérience B, des valeurs de température supérieures à 30°C ont été enregistrées. Elles proviennent de la dérive des sondes qui avaient perdu leur étanchéité. Ces valeurs erronées n'ont donc pas été considérées dans le calcul des températures modales. Ce problème a été résolu avant l'expérimentation suivante en ré-isolant la connexion entre le capteur et le câble électrique à l'aide d'une résine. La fixation des sondes sur les carrousels a également été modifiée afin de ne plus immerger la zone la plus fragile des sondes. Au lieu d'être introduite à travers le couvercle de chaque carrousel, elles sont fixées à travers la paroi verticale de chacun d'eux.

Tableau 102 : Caractéristiques thermiques des 3 essais température. Les valeurs reportées dans la dernière colonne sont celles du ΔT ($T^{\circ}\text{C}$ "Rivière réchauffée" - $T^{\circ}\text{C}$ "Rivière").

Exp.	Dates du suivi	Réacteurs "Rivière"		Réacteurs "Rivière réchauffée"		ΔT "Rivière réchauffée" - "Rivière"
		Température	Différence par rapport à l'eau thermique	Température	Différence par rapport à l'eau thermique	
A	14 avril - 4 mai 2009	12.4 $^{\circ}\text{C}$	-22.6 $^{\circ}\text{C}$	16.4 $^{\circ}\text{C}$	-18.6 $^{\circ}\text{C}$	4 $^{\circ}\text{C}$
B	12 mai – 1 juin 2009	15.7 $^{\circ}\text{C}$	-19.3 $^{\circ}\text{C}$	23.8 $^{\circ}\text{C}$	-11.2 $^{\circ}\text{C}$	8 $^{\circ}\text{C}$
C	9 juin – 29 juin 2009	15.6 $^{\circ}\text{C}$	-19.4 $^{\circ}\text{C}$	27.3 $^{\circ}\text{C}$	-7.7 $^{\circ}\text{C}$	12 $^{\circ}\text{C}$

Pour chacune des 3 expériences effectuées, l'impact de 2 refroidissements différents a été comparé (Figure 185). Il faut par contre noter que les caractéristiques physico-chimiques du cours d'eau sont probablement différentes entre chaque expérimentation. De même, la composition des biofilms utilisés au début des 3 expériences est différente.

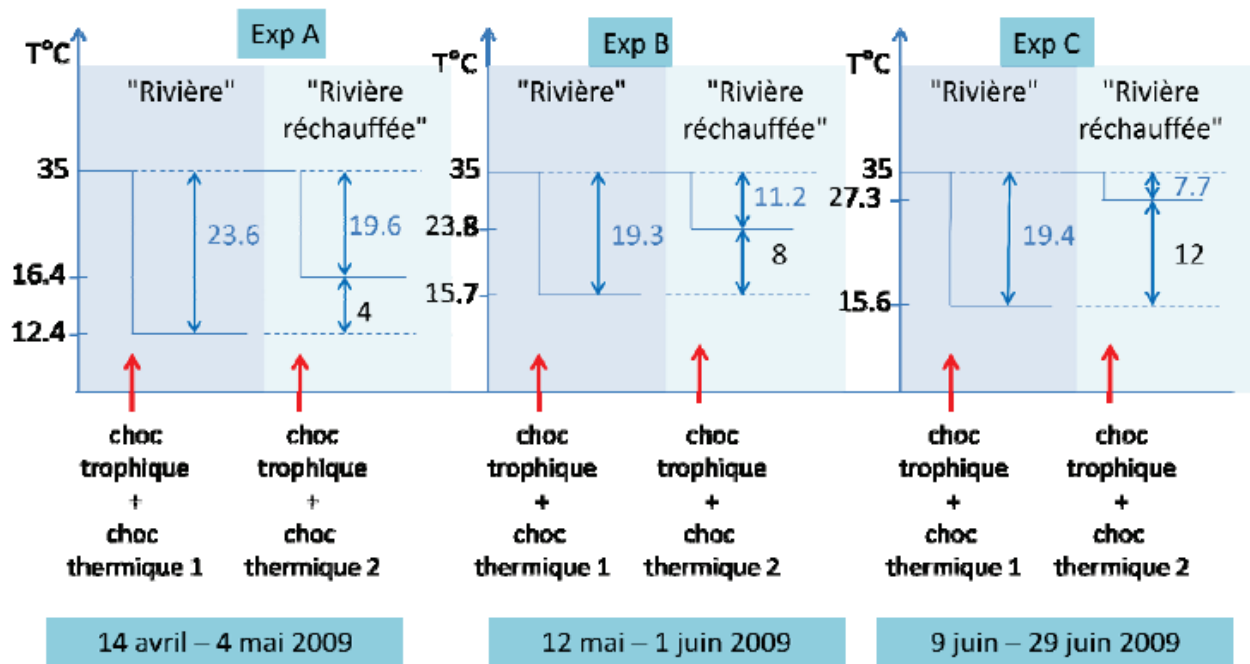


Figure 185 : Caractéristiques des refroidissements testés au cours des 3 expériences.

Les refroidissements testés sont du même ordre de grandeur que la différence de température entre la bache de rejet de l'établissement thermal et la station Parking (située après la confluence avec les sources thermales) à cette même période de l'année (Figure 186). La température du cours d'eau est plus froide que l'eau thermale de 8 à 24°C.

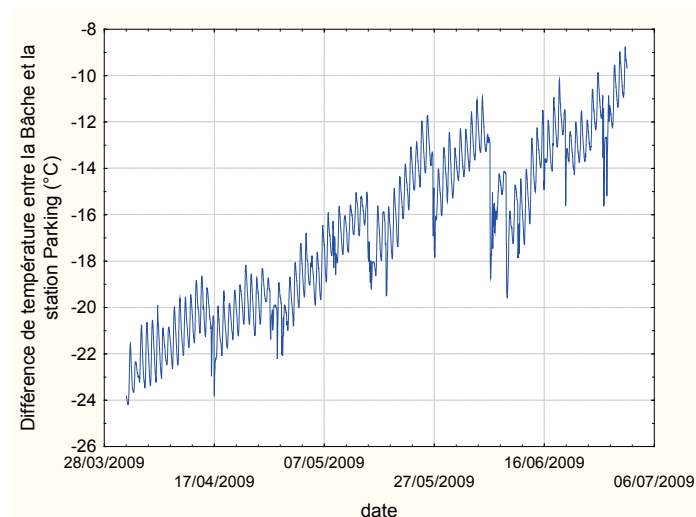


Figure 186 : Différences de température observées entre l'eau de la bache de rejet et la station Parking à la même période que les 3 expériences en réacteurs

Au cours du suivi, les biofilms ont été prélevés selon un pas de temps allant de 1 à 3 jours et traités de la même manière que lors des volets précédents. Les dénombrements de *Lpn* par les méthodes FISH et qPCR n'ont toutefois pas été effectués au cours de cette étude, tout comme la détermination du poids sec du biofilm ainsi que celle de sa fraction organique. Aucune mesure sur l'eau n'a également été réalisée.

Rappelons que la comparaison des valeurs médianes obtenues entre les réacteurs témoins et les réacteurs essais a été effectuée à l'aide du test U de Mann-Whitney avec un intervalle de confiance de 5% (Tableau 105 et Tableau 106). Le choix de ce test par rapport au test des médianes est dû à la présence fréquente de valeurs ex-aequo dans les séries de données (Legendre & Legendre, 1998).

8.1 Evolution de la colonisation des biofilms à travers la concentration en bactéries_{totales}

La dispersion des données autour de la valeur médiane sur l'ensemble de la période pour les 3 expérimentations a été considérée (Tableau 103). Concernant la concentration bactérienne, les biofilms "Rivière" sont moins variables tout au long de la période considérée que les biofilms "Rivière réchauffée" au cours des suivis A et C. Les valeurs présentent une dispersion inférieure à 16.5% dans l'ensemble des cas. Les concentrations en bactéries totales restent donc relativement stables tout au long de l'incubation.

Tableau 103 : Variabilité (MAD/médiane) inter-date des données de concentrations en bactéries_{totales}.

	"Rivière"	"Rivière réchauffée"
Exp. A	10%	15%
Exp. B	17%	13%
Exp. C	6.65%	16%

Ce descripteur présente également une faible dispersion entre les réplicats avec un CV_{MAD} inférieur à 21% (Tableau 104). Le changement de température n'influence pas l'homogénéité des biofilms échantillonnés concernant ce descripteur.

Tableau 104 : Variabilité (MAD/Médiane) inter-réplicats pour la concentration des bactéries_{totales}.

	Exp. A		Exp. B		Exp. C	
	"Rivière"	"Rivière réchauffée"	"Rivière"	"Rivière réchauffée"	"Rivière"	"Rivière réchauffée"
J0	10%	10%	19%	19%	11%	11%
J1	18%	3%	3%	13%	10%	9%
J2	15%	21%	13%	16%	1%	6%
J3	12%	4%	18%	21%	1%	18%
J6	6%	8%	6%	8%	3%	14%
J8	5%	13%	1%	4%	5%	2%
J10	3%	20%	1%	6%	5%	4%
J13	4%	7%	0.5%	12%	8%	0.5%
J15	7%	18%	3%	1%	0.2%	2%
J17	4%	0%	10%	2%	2%	10%
J20	11%	4%	1%	5%	5%	3%

Au cours de ces 3 expériences, la concentration des bactéries_{totales} à J0 varie en fonction de la période de développement (Figure 187). En effet, les biofilms de la bêche se sont enrichis en bactéries_{totales} entre les mois d'avril, de mai et de juin 2009 (2.27×10^4 bact/mm², 3.11×10^4 bact/mm² et 6.24×10^4 bact/mm² respectivement).

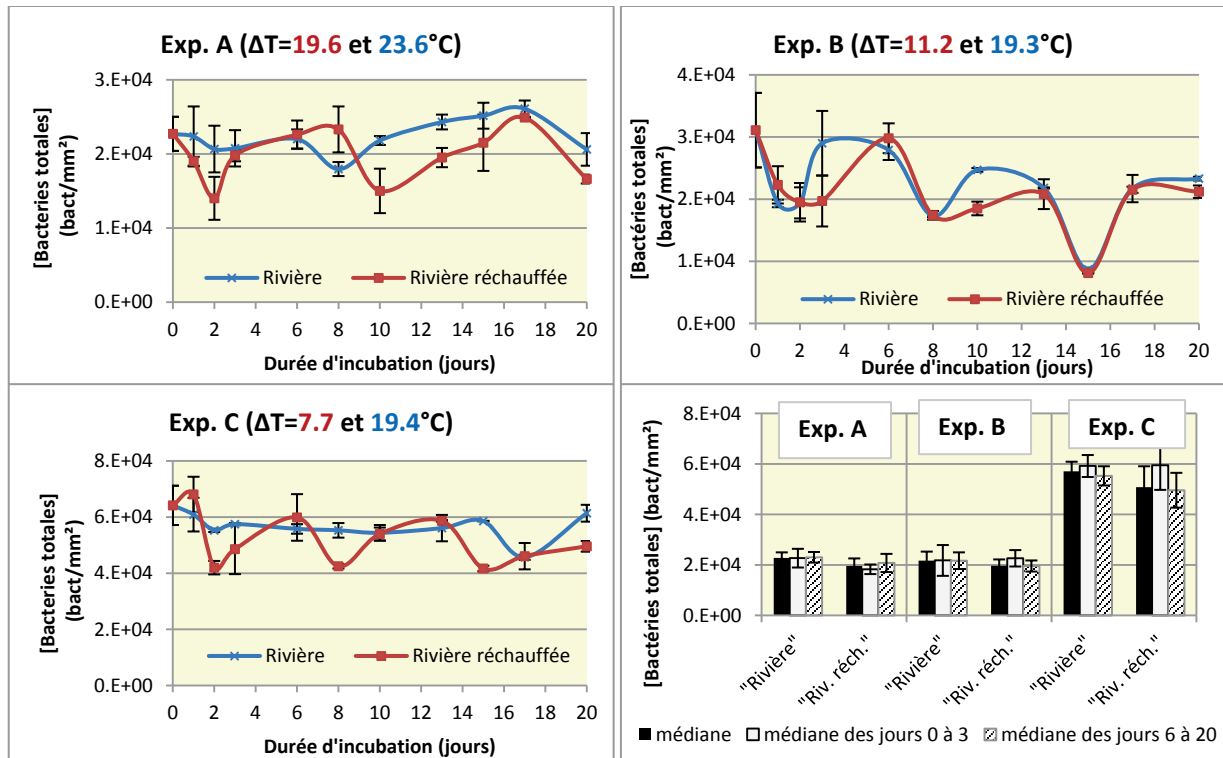


Figure 187 : Evolution de la concentration en bactéries_{totales} au cours de l'incubation des biofilms en fonction de la température de l'eau recevant les biofilms. Valeurs médianes des concentrations en bactéries totales pour l'ensemble du suivi, pour la période réunissant les 3 premiers jours, pour la période allant du sixième au vingtième jour ("Riv. réch." : "Rivière réchauffée"). Les barres d'erreurs correspondent au MAD.

Au cours des 20 jours que dure chaque suivi, la concentration de bactéries_{totales} n'est pas significativement différente entre les biofilms des réacteurs "Rivière" et "Rivière réchauffée" (Tableau 105). De plus, aucune tendance ne se distingue au sein de chacune des cinétiques, mis à part une baisse plus ou moins importante des concentrations bactériennes lors des 2 premiers jours de l'incubation. Cette baisse peut s'expliquer par le changement de milieu des biofilms. En effet, ils se développent tout d'abord dans un milieu quasi stagnant et chaud (la bêche de rejets), puis ils sont placés à l'intérieur des réacteurs, dans un milieu peut être plus pauvre (car situé dans la partie souterraine du réseau et dans sa partie amont), où la vitesse d'écoulement de l'eau est plus forte et à une température qui, dans tous les cas, est inférieure à celle de la bêche. Cette baisse des concentrations bactériennes reste du même ordre de grandeur que les oscillations observées ensuite au cours de l'incubation. Ceci est confirmé par l'absence de différence significative entre la valeur de la médiane calculée sur les 3 premiers jours de l'incubation et celle calculée sur les jours restants (jours 6 à 20).

D'une manière générale, il est possible de conclure que la température de l'eau recevant des fragments de biofilms n'a pas d'impact sur la concentration bactérienne totale des biofilms.

Tableau 105 : p-values données par le test de Mann Whitney appliqué à la comparaison des concentrations obtenues dans les biofilms "Rivière" et "Rivière réchauffée", des descripteurs suivants : bactéries_{totales}, bactéries_{cultivables}, Lpn_{totales}, Lpn_{cultivables}, proportions des bactéries_{cultivables}, des Lpn_{totales} et des Lpn_{cultivables}. Le calcul a été fait pour chaque jour et pour chacune des 3 différences de température. La différence est significative pour p≤0.05 (valeur en rouge et en gras).

Jour	Bactéries totales			Bactéries cultivables			Lpn totales			Lpn cultivables		
	Exp. A	Exp. B	Exp. C	Exp. A	Exp. B	Exp. C	Exp. A	Exp. B	Exp. C	Exp. A	Exp. B	Exp. C
1	0.564	0.190	0.127	0.083	0.275	0.513	0.083	0.827	0.383	0.083	0.275	0.050
2	0.083	0.827	0.050	0.248	0.513	0.564	0.248	0.275	0.275	0.564	0.275	0.050
3	0.564	0.275	0.275	0.248	0.513	0.827	0.149	0.050	0.050	0.248	0.513	0.050
6	1.000	0.513	0.513	1.000	0.513	0.050	1.000	0.513	0.050	0.564	0.050	0.050
8	0.083	0.827	0.050	0.386	0.050	0.050	0.564	0.663	0.050	0.564	0.827	0.050
10	0.083	0.275	0.513	0.564	0.050	0.127	0.564	0.827	0.050	0.149	0.050	0.050
13	0.083	0.513	0.275	0.083	0.513	0.190	1.000	0.190	0.050	0.083	0.050	0.050
15	0.248	0.127	0.050	0.083	0.127	0.513	1.000	0.275	0.050	0.564	0.050	0.050
17	0.083	0.827	0.827	0.083	0.083	0.513	0.564	0.827	0.383	0.083	0.050	0.050
20	0.564	0.275	0.127	0.564	0.827	0.275	1.000	0.081	0.050	0.564	0.050	0.050

Jour	Proportion de Bactéries cultivables			Proportion de Lpn totales			Proportion de Lpn cultivables		
	Exp. A	Exp. B	Exp. C	Exp. A	Exp. B	Exp. C	Exp. A	Exp. B	Exp. C
1	0.083	0.827	0.275	0.083	0.275	0.275	0.564	0.275	0.050
2	0.083	0.275	0.050	0.083	0.275	0.050	0.248	0.827	0.050
3	0.564	0.827	0.513	0.248	0.127	0.050	0.564	0.127	0.127
6	0.773	0.513	0.050	1.000	0.827	0.050	0.248	0.050	0.050
8	0.083	0.050	0.050	0.564	0.827	0.050	0.564	0.513	0.050
10	0.564	0.050	0.050	0.083	0.827	0.050	0.083	0.050	0.050
13	0.248	0.513	0.275	1.000	0.275	0.050	0.248	0.050	0.050
15	0.248	0.127	0.513	0.773	0.127	0.050	0.248	0.050	0.050
17	0.083	0.127	0.513	0.564	0.827	0.383	0.248	0.050	0.050
20	0.564	0.513	0.050	0.564	0.050	0.050	0.564	0.275	0.050

Tableau 106 : p-values données par le test de Mann Whitney appliqué à la comparaison des concentrations obtenues dans les biofilms "Rivière" et "Rivière réchauffée", des descripteurs suivants : concentrations d'amibes, de ciliés, de flagellés et de l'ensemble des protistes, ainsi que la proportion de chaque groupe de protistes. Le calcul a été fait pour chaque jour et pour chacune des 3 différences de température. La différence est significative pour $p \leq 0.05$ (valeur en rouge et en gras).

Jour	Amibes			Ciliés			Flagellés			Protistes		
	Exp. A	Exp. B	Exp. C	Exp. A	Exp. B	Exp. C	Exp. A	Exp. B	Exp. C	Exp. A	Exp. B	Exp. C
1	0.149	0.127	0.190	0.248	0.513	0.190	0.564	0.275	0.513	0.248	0.127	0.827
2	0.149	0.050	0.050	1.000	0.827	0.190	0.386	0.663	0.275	0.083	0.050	0.827
3	0.083	0.827	0.663	0.149	0.127	0.050	0.248	0.513	0.663	0.083	0.275	0.275
6	0.773	0.275	0.190	0.386	0.190	0.663	0.248	0.050	0.050	0.248	0.275	0.275
8	0.773	0.127	0.513	0.083	0.190	0.190	0.083	0.383	0.827	0.083	0.050	0.513
10	0.773	0.050	0.827	0.773	0.190	0.513	0.248	0.275	0.383	0.248	0.050	0.513
13	0.083	0.050	0.513	0.564	0.190	0.190	0.083	0.127	0.513	0.833	0.050	0.513
15	0.248	0.275	1.000	0.773	0.513	0.513	1.000	0.827	0.513	1.000	0.275	0.513
17	0.564	0.383	0.127	0.564	1.000	0.513	0.083	0.827	0.275	0.083	0.513	0.827
20	0.083	0.050	0.663	0.564	0.513	0.513	0.083	0.081	0.050	0.083	0.050	0.081

Jour	Proportion d'amibes			Proportion de ciliés			Proportion de flagellés		
	Exp. A	Exp. B	Exp. C	Exp. A	Exp. B	Exp. C	Exp. A	Exp. B	Exp. C
1	0.083	0.050	0.513	0.248	0.513	0.190	0.564	0.275	0.513
2	1.000	0.275	0.275	0.564	0.827	0.190	0.387	0.513	0.275
3	0.248	0.513	0.827	0.564	0.513	0.050	0.248	0.513	0.827
6	0.083	0.050	0.050	0.387	0.663	0.050	0.248	0.383	0.050
8	0.083	0.513	0.513	0.083	0.275	0.190	0.083	0.827	0.827
10	0.564	0.827	0.383	0.387	0.513	0.827	0.248	0.827	0.383
13	0.083	0.513	0.513	0.564	0.513	0.190	0.083	0.827	0.513
15	1.000	0.827	0.513	0.387	0.827	0.513	1.000	0.827	0.513
17	0.248	0.275	0.127	0.564	0.827	0.513	0.564	1.000	0.275
20	0.248	0.275	0.050	1.000	0.513	0.513	0.083	0.275	0.050

8.2 Concentrations et proportions des bactéries_{cultivables}

Comme pour les résultats des deux volets précédents, on considère ici toutes les espèces capables de former des colonies à 25°C sur milieux TSA pendant 4 jours. On peut remarquer que la concentration des bactéries_{cultivables} ne prend pas en compte les *Lpn*_{cultivables} qui ne forment des colonies que sur des milieux spécifiques.

8.2.1 Concentrations des bactéries_{cultivables}

Le calcul de la dispersion des données sur l'ensemble de la période ne montre pas d'impact marqué de la température sauf au cours de l'expérimentation B où la hausse de température stabilise les concentrations des bactéries_{cultivables} (Tableau 107). Les fluctuations les plus marquées ont lieu lors de l'expérimentation A avec un CV_{MAD} supérieur à 60% à la fois pour les biofilms "Rivière" et "Rivière réchauffée" contre des CV_{MAD} inférieurs à 55% et plus fréquemment inférieurs à 40% au cours des autres suivis. On note également que ce descripteur est plus variable que la concentration en bactéries_{totales}.

Tableau 107 : Variabilité (MAD/Médiane) inter-date des données de concentrations en bactéries_{cultivables}.

	"Rivière"	"Rivière réchauffée"
Exp. A	65%	62%
Exp. B	52%	30%
Exp. C	38%	40%

Les biofilms sont un peu moins homogènes pour ce descripteur que pour les concentrations de bactéries_{totales} (Tableau 108). En effet, pour la plupart des dates, le CV_{MAD} est compris entre 10 et 30%. Certaines dates montrent une hétérogénéité plus marquée avec un CV_{MAD} de 60%.

Là encore l'augmentation de la température ne semble pas influencer l'homogénéité de ce descripteur.

Tableau 108 : Variabilité (MAD/Médiane) inter-réplicats pour la concentration en bactéries_{cultivables}.

	Exp. A		Exp. B		Exp. C	
	"Rivière"	"Rivière réchauffée"	"Rivière"	"Rivière réchauffée"	"Rivière"	"Rivière réchauffée"
J0	0%	0%	2%	2%	29%	29%
J1	19%	4%	7%	29%	19%	20%
J2	27%	22%	60%	14%	21%	4%
J3	24%	14%	3%	47%	0%	6%
J6	0%	47%	7%	15%	8%	12%
J8	27%	14%	7%	11%	0%	10%
J10	30%	22%	20%	19%	0%	20%
J13	7%	10%	29%	6%	5%	11%
J15	27%	24%	59%	2%	30%	21%
J17	3%	2%	0%	15%	17%	2%
J20	8%	33%	42%	7%	23%	3%

Comme pour la concentration des bactéries_{totales}, la concentration des bactéries_{cultivables} à J0 a tendance à augmenter entre les 3 expériences (Figure 188).

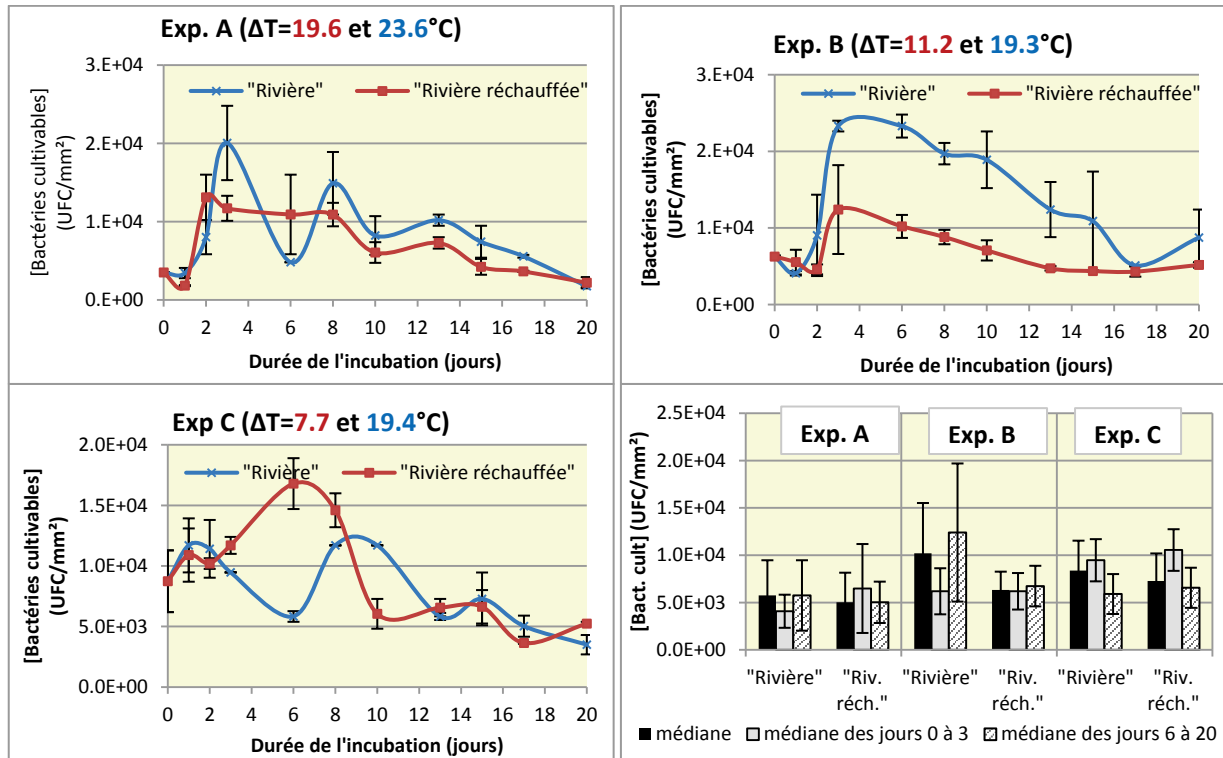


Figure 188 : Evolution dans le temps de la concentration en bactéries_{cultivables} au cours de l'incubation des biofilms pour les deux températures de l'eau recevant les biofilms. Valeurs médianes des concentrations en bactéries_{cultivables} pour l'ensemble du suivi, pour la période réunissant les 3 premiers jours, pour la période allant du sixième au vingtième jour ("Riv. réch." : "Rivière réchauffée").
Les barres d'erreurs correspondent au MAD.

On dénombre à J0 3.5×10^3 UFC/mm² pour la première expérience, 6.3×10^3 UFC/mm² lors de la deuxième expérience et enfin 8.7×10^3 UFC/mm² à la dernière expérience. Après le transfert dans les réacteurs, cette concentration se stabilise pendant un ou deux jours (expérience A et B) puis elle augmente fortement au cours des jours suivants. La concentration maximale est observée entre les jours 2 et 6 selon les cas. Puis, quelles que soient les conditions de températures, la tendance générale est une baisse de cette concentration.

Après 20 jours de suivi, la concentration des bactéries_{cultivables} n'est pas significativement différente de celle de départ, à l'exception de l'expérience C où la concentration finale est significativement inférieure à celle de début à la fois pour les biofilms "Rivière" et "Rivière réchauffée".

Tout au long du suivi, seules quelques dates montrent une différence significative entre les échantillons "Rivière" et "Rivière réchauffée". Mais, globalement ces résultats montrent que la température de l'eau recevant les biofilms n'a pas d'effet marqué sur l'évolution de la concentration des bactéries_{cultivables}. Ces résultats laissent supposer un effet de la composition initiale du biofilm sur son évolution.

La séparation entre les premiers jours d'incubation et les autres jours met en évidence une différence significative entre ces deux périodes uniquement pour le témoin de l'expérience B où la médiane est supérieure pour la deuxième période du suivi (jours 6 à 20) et pour l'expérience C où la médiane des premiers jours est supérieure à celle des jours 6 à 20 à la fois dans les biofilms "Rivière" et "Rivière réchauffée".

8.2.2 Proportions de bactéries_{cultivables}

La dispersion des données est également étudiée pour les différents rapports suivis. Comme précédemment elle ne met pas en évidence d'effet marqué de la température, que ce soit en terme de variabilité inter-dates ou inter-réplicats (Tableau 109 et Tableau 110).

Tableau 109 : Variabilité (MAD/Médiane) inter-date des données des proportions en bactéries_{cultivables} (Bactéries_{cultivables}/Bactéries_{totales}).

	"Rivière"	"Rivière réchauffée"
Exp. A	58%	61%
Exp. B	52%	35%
Exp. C	27%	33%

Tableau 110 : Variabilité (MAD/Médiane) inter-réplicats pour la proportion des bactéries_{cultivables} (Bactéries_{cultivables}/Bactéries_{totales}).

	Exp. A		Exp. B		Exp. C	
	"Rivière"	"Rivière réchauffée"	"Rivière"	"Rivière réchauffée"	"Rivière"	"Rivière réchauffée"
J0	10%	10%	10%	10%	19%	19%
J1	36%	1%	10%	11%	11%	25%
J2	13%	27%	2%	12%	33%	6%
J3	12%	10%	14%	17%	1%	8%
J6	0%	41%	1%	6%	11%	1%
J8	22%	11%	13%	7%	5%	12%
J10	33%	2%	5%	14%	9%	11%
J13	11%	24%	15%	17%	18%	6%
J15	34%	11%	57%	1%	11%	5%
J17	1%	2%	10%	52%	2%	8%
J20	19%	28%	37%	3%	21%	2%

Les variations des proportions des bactéries_{cultivables} au sein de la communauté bactérienne suivent la même évolution que les concentrations des bactéries_{cultivables} (Figure 189).

Comme précédemment, seules quelques dates mettent en évidence une différence significative entre les échantillons "Rivière" et "Rivière réchauffée", ceci principalement pour la troisième expérience. On remarque que lors de la deuxième expérience les biofilms "Rivière" sont, aux jours 8 et 15, principalement constitués de bactéries_{cultivables}, mais les biofilms placés dans les réacteurs à J0 pour cette deuxième expérience sont composés d'une communauté bactérienne plus cultivable que pour les deux autres expériences : la proportion des bactéries_{cultivables} est de 24% lors de l'expérience B contre 14 et 13% pour les deux autres. Seul le témoin de l'expérience C montre une baisse significative entre le début et la fin de la période suivie, dans tous les autres cas, la fraction cultivable à la fin de la période est équivalente à celle de départ.

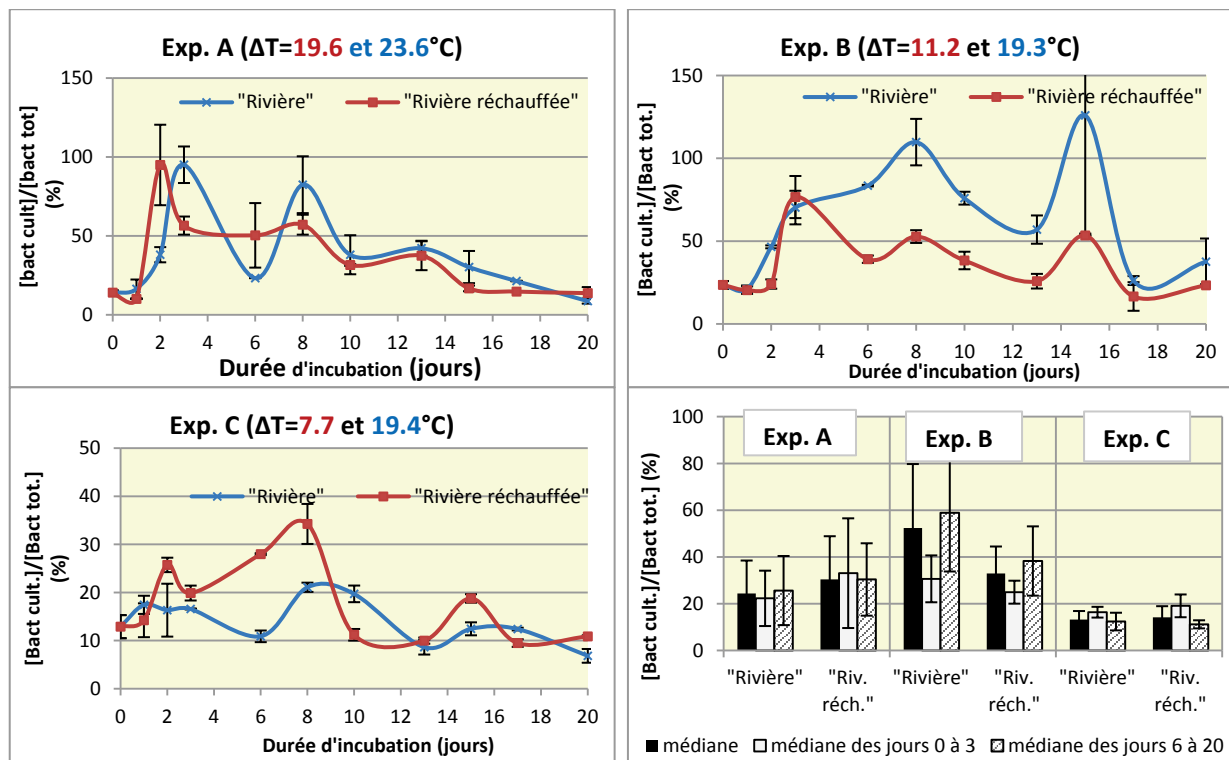


Figure 189 : Evolution de la proportion des bactéries_{cultivables} au cours de l'incubation des biofilms en fonction de la température de l'eau recevant les biofilms. Valeurs médianes des proportions en bactéries_{cultivables} pour l'ensemble du suivi, pour la période réunissant les 3 premiers jours, pour la période allant du sixième au vingtième jour ("Riv. réch." : "Rivière réchauffée"). Les barres d'erreurs correspondent au MAD.

Ces résultats montrent que la température de l'eau recevant des biofilms jeunes n'a pas d'effet sur la communauté bactérienne cultivable du biofilm pendant la période suivie. Un suivi à plus long terme permettrait de confirmer cette conclusion.

Ces résultats ne permettent pas de montrer s'il existe un changement des espèces bactériennes, cultivables ou non, constituant le biofilm au cours de cette période. Des mesures de diversité et des séquençages seraient nécessaires pour répondre à cette question.

8.3 Concentrations et proportions de Lpn_{totales}

8.3.1 Concentration de Lpn_{totales}

L'homogénéité des Lpn_{totales} dans le biofilms, que ce soit entre les dates de prélèvements ou entre les réplicats à chacune des dates, n'est pas affectée par les modifications de température (Tableau 111 et Tableau 112). L'hétérogénéité inter-réplicats est du même ordre de grandeur que celle observée précédemment pour les concentrations des bactéries $Lpn_{\text{cultivables}}$.

Tableau 111 : Variabilité (MAD/Médiane) inter-date des données des concentrations en Lpn_{totales} .

	"Rivière"	"Rivière réchauffée"
Exp. A	37%	36%
Exp. B	41%	47%
Exp. C	31%	30%

Tableau 112 : Variabilité (MAD/Médiane) inter-réplicats pour les concentrations en Lpn_{totales} .

	Exp. A		Exp. B		Exp. C	
	"Rivière"	"Rivière réchauffée"	"Rivière"	"Rivière réchauffée"	"Rivière"	"Rivière réchauffée"
J0	13%	13%	28%	28%	32%	32%
J1	6%	0%	19%	3%	45%	6%
J2	39%	6%	6%	25%	5%	9%
J3	43%	21%	29%	12%	17%	9%
J6	62%	20%	0%	20%	8%	0%
J8	6%	14%	16%	8%	17%	10%
J10	23%	16%	43%	17%	11%	0%
J13	30%	10%	54%	58%	9%	13%
J15	66%	0%	14%	14%	28%	10%
J17	60%	20%	0%	40%	10%	34%
J20	54%	11%	28%	6%	0%	3%

La concentration de Lpn_{totales} à J0 est très variable selon la période : elle est inférieure à 400 Lpn/mm^2 pour la première et la dernière expérimentation, mais on dénombre jusqu'à 840 Lpn/mm^2 au cours de la seconde (Figure 190).

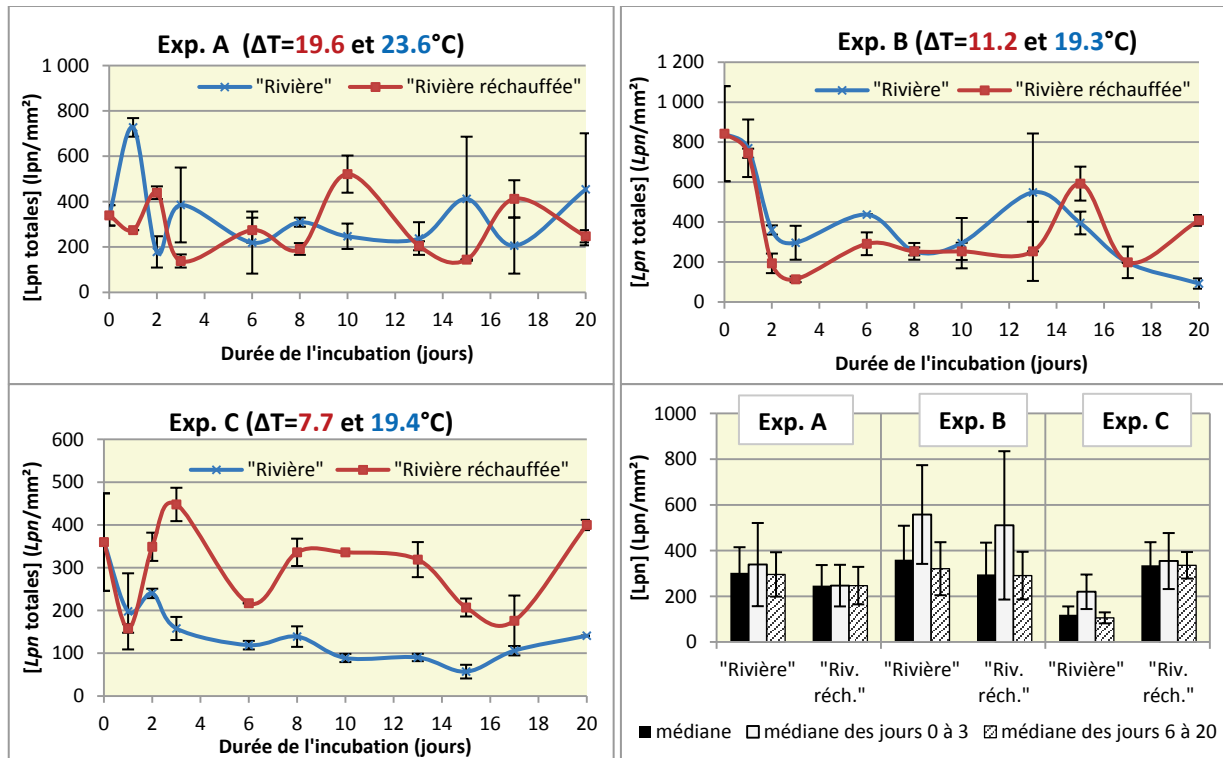


Figure 190 : Evolution de la concentration en Lpn_{totales} (immuno) au cours de l'incubation des biofilms en fonction de la température de l'eau recevant les biofilms. Valeurs médianes des concentrations en Lpn_{totales} pour l'ensemble du suivi, pour la période réunissant les 3 premiers jours, pour la période allant du sixième au vingtième jour ("Riv. réch." : "Rivière réchauffée"). Les barres d'erreurs correspondent au MAD.

A l'exception du premier jour d'incubation de l'expérience A et du troisième jour de l'expérience B, les concentrations de Lpn_{totales} dans les biofilms "Rivière" et "Rivière réchauffée" ne sont pas significativement différentes pour les deux premiers tests. Par contre, pour le plus petit refroidissement ($\Delta T = 7.7^\circ\text{C}$, Exp. C), la différence entre les biofilms "Rivière" et "Rivière réchauffée" est significative à partir du troisième jour d'incubation et persiste jusqu'à la fin du suivi (sauf au jour 17). Le refroidissement de 7.7°C permet donc une augmentation de la concentration de Lpn_{totales} par rapport au refroidissement de 19.4°C (eau de la rivière).

La température influence les concentrations en Lpn_{totales} uniquement lorsque le refroidissement est le plus faible : 7.7°C . La température de l'eau étant alors de 27.3°C .

8.3.2 Proportions de Lpn_{totales}

De la même manière que la température n'influence pas l'homogénéité des concentrations de Lpn_{totales} et celle des bactéries_{totales} (Tableau 113 et Tableau 114), la dispersion des proportions de Lpn_{totales} ne montre pas de variations qui peuvent s'expliquer par les changements de température.

Tableau 113 : Variabilité (MAD/Médiane) inter-date des données des proportions de Lpn_{totales} ($Lpn_{\text{totales}}/Bactéries_{\text{totales}}$).

	"Rivière"	"Rivière réchauffée"
Exp. A	45%	41%
Exp. B	48%	54%
Exp. C	30%	36%

Tableau 114 : Variabilité (MAD/Médiane) inter-réplicats des proportions de Lpn_{totales} ($Lpn_{\text{totales}}/Bactéries_{\text{totales}}$).

	Exp. A		Exp. B		Exp. C	
	"Rivière"	"Rivière réchauffée"	"Rivière"	"Rivière réchauffée"	"Rivière"	"Rivière réchauffée"
J0	14%	14%	7%	7%	15%	15%
J1	24%	14%	13%	5%	37%	4%
J2	25%	13%	35%	36%	7%	20%
J3	33%	18%	39%	5%	11%	4%
J6	59%	4%	11%	11%	5%	27%
J8	2%	5%	16%	4%	4%	11%
J10	20%	45%	44%	24%	6%	5%
J13	34%	3%	48%	26%	13%	8%
J15	70%	15%	17%	13%	8%	26%
J17	63%	40%	11%	39%	22%	11%
J20	46%	24%	13%	8%	0	8%

Il est possible de faire les mêmes observations concernant la cinétique des proportions de Lpn_{totales} au sein de la communauté bactérienne totale que précédemment concernant leur concentration (Figure 191).

Les Lpn_{totales} représentent 1.69 % et 2.71 % de la communauté bactérienne des biofilms lors des deux premiers essais, mais seulement 0.5% lors du dernier. Lors des deux premiers essais, la proportion de Lpn_{totales} se maintient dans les biofilms, sans différence significative entre les biofilms "Rivière" et "Rivière réchauffée". Comme pour la concentration de Lpn_{totales} , lors du plus faible refroidissement, soit un ΔT de 7.7°C, la proportion de Lpn augmente dès le deuxième jour de l'incubation et se maintient à une valeur nettement supérieure à celle de départ. Dès le deuxième jour, par rapport au refroidissement de 19.4°C, le refroidissement de 7.7°C favorise le développement des Lpn_{totales} dans la communauté bactérienne. Ceci probablement au détriment d'autres espèces, car, comme cela a été montré précédemment, la même augmentation de température n'a pas d'effet marqué sur la concentration des bactéries_{totales}.

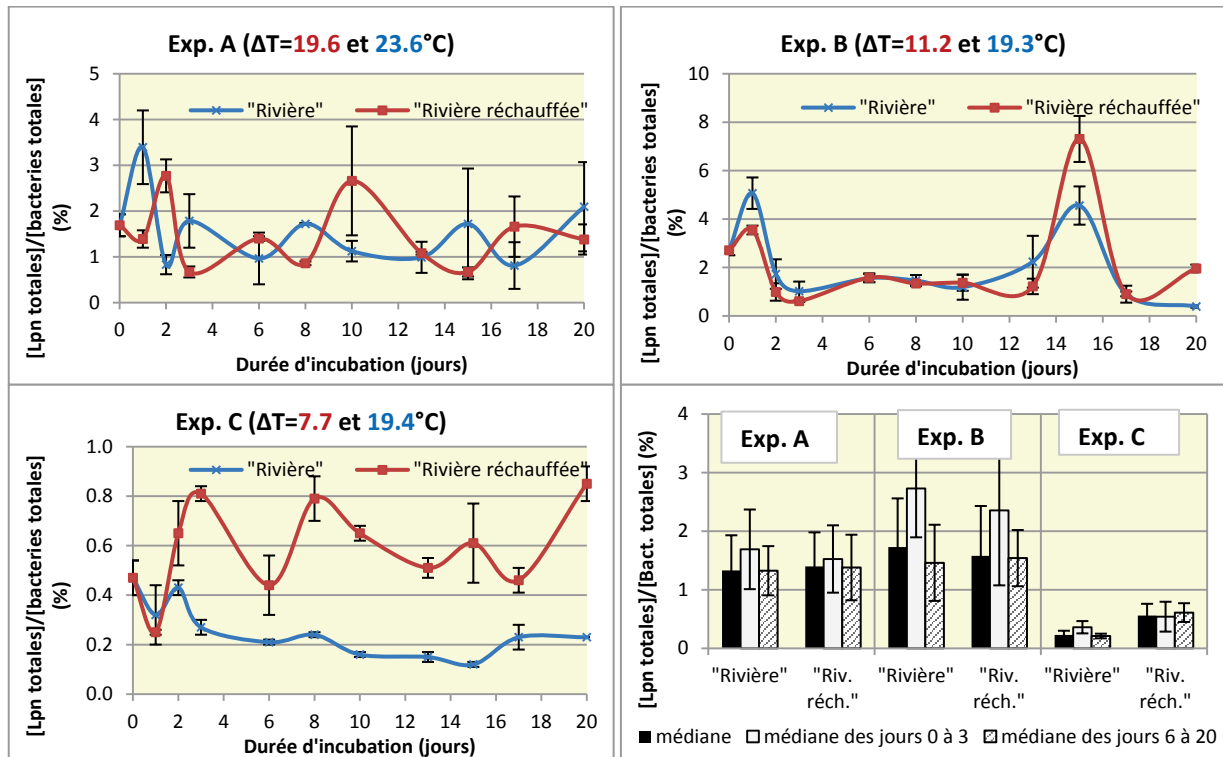


Figure 191 : Evolution de la proportion des Lpn_{totales} au sein du biofilm au cours de l'incubation des biofilms en fonction de la température de l'eau recevant les biofilms. Valeurs médianes des proportions en Lpn_{totales} pour l'ensemble du suivi, pour la période réunissant les 3 premiers jours, pour la période allant du sixième au vingtième jour ("Riv. réch." : "Rivière réchauffée"). Les barres d'erreurs correspondent au MAD.

La température a donc un effet sur les concentrations et les proportions de Lpn_{totales} uniquement dans le cas du plus faible refroidissement (7.7°C soit une température de l'eau de 27.3°C).

Il est également important de constater que le transfert de biofilms contenant Lpn , même au sein d'un environnement moins chaud que leur milieu d'origine (bâche), n'engendre pas la disparition de cette espèce.

8.4 Concentrations et proportions de $Lpn_{\text{cultivables}}$ (GVPC)

8.4.1 Concentrations de $Lpn_{\text{cultivables}}$

La variabilité des concentrations de $Lpn_{\text{cultivables}}$ au cours de ces différents suivis est supérieure à celle des autres descripteurs, mais comme pour les autres descripteurs elle ne semble pas influencée par les modifications de la température (Tableau 115).

Tableau 115 : Variabilité (MAD/Médiane) inter-date des données des concentrations de *Lpn*_{cultivables}.

	"Rivière"	"Rivière réchauffée"
Exp. A	77%	80%
Exp. B	48%	50%
Exp. C	47%	35%

La même observation peut être effectuée lorsque l'on considère la variabilité inter-réplicats des concentrations de *Lpn*_{cultivables} dans les biofilms (Tableau 116).

Tableau 116 : Variabilité (MAD/Médiane) inter-réplicats pour les concentrations de *Lpn*_{cultivables}.

	Exp. A		Exp. B		Exp. C	
	"Rivière"	"Rivière réchauffée"	"Rivière"	"Rivière réchauffée"	"Rivière"	"Rivière réchauffée"
J0	14%	14%	8%	8%	73%	73%
J1	3%	37%	0%	0%	12%	37%
J2	18%	47%	68%	17%	34%	47%
J3	44%	28%	46%	17%	6%	13%
J6	14%	0%	15%	0%	12%	15%
J8	44%	16%	31%	8%	19%	4%
J10	29%	25%	30%	8%	3%	19%
J13	0%	20%	25%	6%	36%	5%
J15	28%	20%	75%	38%	0%	8%
J17	14%	64%	83%	9%	14%	4%
J20	60%	13%	71%	5%	12%	25%

La concentration de *Lpn*_{cultivables} des biofilms lors de leur dépôt dans les réacteurs est respectivement de 42, 36 ou 70 UFC/mm² de biofilm pour les expériences A, B et C (Figure 192).

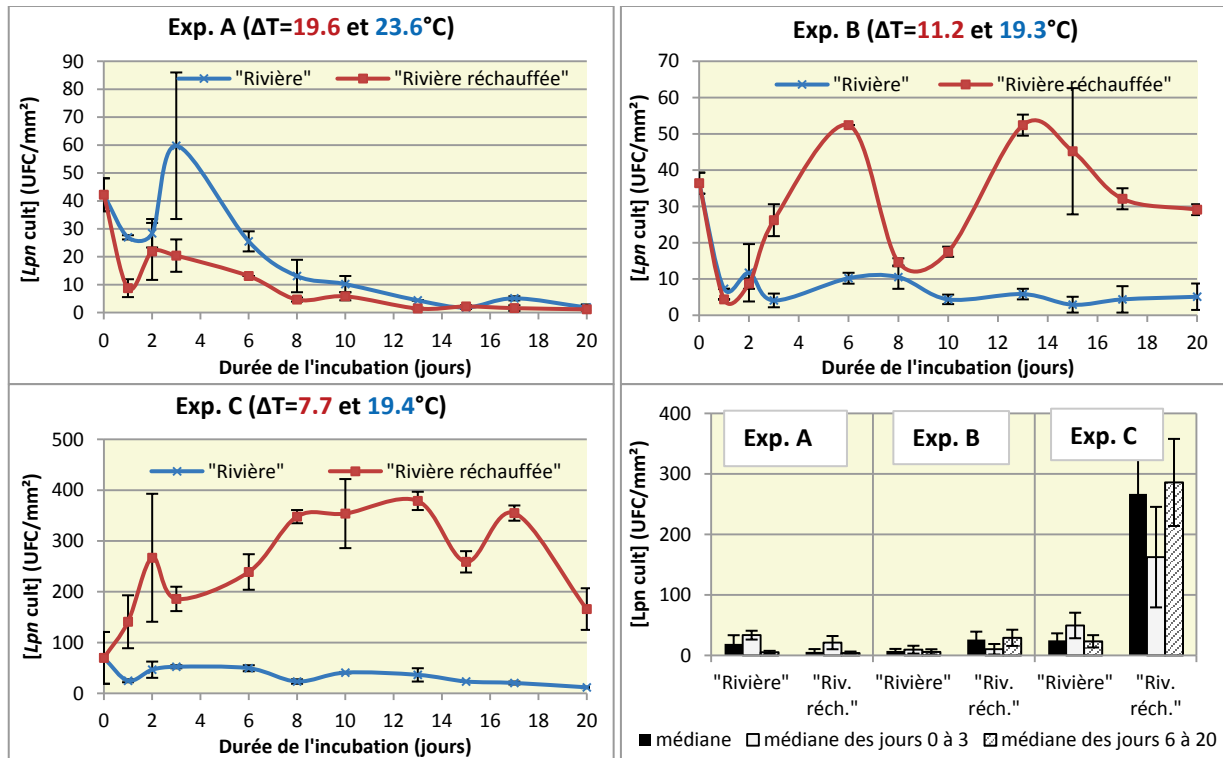


Figure 192 : Evolution de la concentration en $Lpn_{\text{cultivables}}$ au cours de l'incubation des biofilms en fonction de la température de l'eau recevant les biofilms. Valeurs médianes des concentrations en $Lpn_{\text{cultivables}}$ pour l'ensemble du suivi, pour la période réunissant les 3 premiers jours, pour la période allant du sixième au vingtième jour ("Riv. réch." : "Rivière réchauffée"). Les barres d'erreurs correspondent au MAD.

Lors du premier suivi (**expérience A**), cette concentration diminue tout au long de la période étudiée. L'évolution dans les réacteurs "Rivière" est très proche de celle des réacteurs "Rivière réchauffée". Seuls les jours 1 et 13 sont caractérisés par une différence significative entre les biofilms "Rivière" et "Rivière réchauffée". On remarque que la concentration de $Lpn_{\text{cultivables}}$ chute d'abord fortement lors du premier jour dans les réacteurs, il s'agit probablement d'une réponse au changement de milieu. Puis les concentrations de $Lpn_{\text{cultivables}}$ augmentent pendant 2 jours pour atteindre une concentration qui peut dépasser la concentration du jour J0.

Lors de la deuxième expérimentation (**expérience B**), les réacteurs "Rivière" présentent la même évolution que lors de la première expérience. Par contre, les réacteurs "Rivière réchauffée" montrent quelques différences. Comme précédemment, la concentration baisse au premier jour de l'incubation, mais ensuite elle présente des fluctuations très marquées passant de quelques colonies à plus de 50 UFC/mm² de biofilm. Au jour 6, puis à partir du jour 10, les concentrations observées dans les biofilms "Rivière réchauffée" sont significativement supérieures à celles des biofilms "Rivière". A la fin de la période suivie, la concentration de $Lpn_{\text{cultivables}}$ des biofilms "Rivière réchauffée" se maintient à une concentration équivalente à la concentration du jour J0.

Le plus faible refroidissement (**expérience C**) a un effet encore plus marqué sur la concentration de $Lpn_{\text{cultivables}}$ avec une différence significative entre les biofilms "Rivière" et "Rivière réchauffée" dès le premier jour du suivi. Comme précédemment, la concentration de $Lpn_{\text{cultivables}}$ diminue dès le premier jour d'incubation dans les réacteurs "Rivière", tandis qu'elle augmente fortement dans les biofilms incubés dans les réacteurs "Rivière réchauffée". Il s'agit du seul cas où la concentration de $Lpn_{\text{cultivables}}$ ne diminue pas au cours de l'incubation dans les réacteurs.

8.4.2 Proportions de $Lpn_{cultivables}$ (Figure 193).

La dispersion des données entre les jours d'incubation dans les réacteurs (Tableau 117) ainsi qu'entre les réplicats pour chaque date (Tableau 118) est du même ordre de grandeur pour les proportions de $Lpn_{cultivables}$ que pour leurs concentrations. Elle n'est également pas influencée par les changements de températures testés.

Tableau 117 : Variabilité (MAD/médiane) inter-date des proportions de $Lpn_{cultivables}$ ($Lpn_{cultivables}/Lpn_{totales}$).

	"Rivière"	"Rivière réchauffée"
Exp. A	77%	78%
Exp. B	74%	45%
Exp. C	41%	44%

Tableau 118 : Variabilité (MAD/Médiane) inter-réplicats des proportions de $Lpn_{cultivables}$ ($Lpn_{cultivables}/Lpn_{totales}$).

	Exp. A		Exp. B		Exp. C	
	"Rivière"	"Rivière réchauffée"	"Rivière"	"Rivière réchauffée"	"Rivière"	"Rivière réchauffée"
J0	23%	23%	12%	12%	44%	44%
J1	8%	5%	23%	7%	33%	59%
J2	53%	6%	81%	56%	12%	14%
J3	1%	53%	66%	56%	63%	23%
J6	70%	17%	43%	29%	41%	20%
J8	39%	28%	32%	18%	33%	3%
J10	48%	8%	80%	35%	16%	12%
J13	30%	6%	51%	28%	26%	0.2%
J15	47%	61%	70%	23%	1%	27%
J17	68%	81%	36%	31%	5%	11%
J20	9%	51%	37%	16%	12%	30%

Lorsque les biofilms sont récupérés après une semaine de développement dans la bache (J0), 14% des Lpn qu'ils contiennent sont dans un état cultivable au cours du premier et du dernier essai, tandis que seules 4% sont cultivables lors du deuxième test (Figure 193).

Comme précédemment au cours des expériences concernant l'effet de la vitesse de l'eau sur le développement de Lpn dans les biofilms, on constate que la proportion de Lpn à J0 est fortement supérieure à celle observée dans le cas de biofilms échantillonnés en rivière (chapitres 4, 5 et 6). A l'exception de l'expérience A, cette proportion reste élevée tout au long du suivi, même pour les températures les plus basses.

Dans les biofilms "Rivière" et "Rivière réchauffée" pour un refroidissement de 19.6 et 11.2°C, la fraction de $Lpn_{cultivables}$ peut atteindre 20% des $Lpn_{totales}$. Lors de la troisième expérimentation, soit un refroidissement de 7.7 ou 19.4°C, cette fraction peut atteindre 50% dans le cas des biofilms "Rivière" et 100% dans le cas des biofilms "Rivière réchauffée". Les valeurs supérieures à 100% s'expliquent par l'hétérogénéité des suspensions de biofilms et le fait que de petits volumes sont utilisés pour les comptages en microscopie.

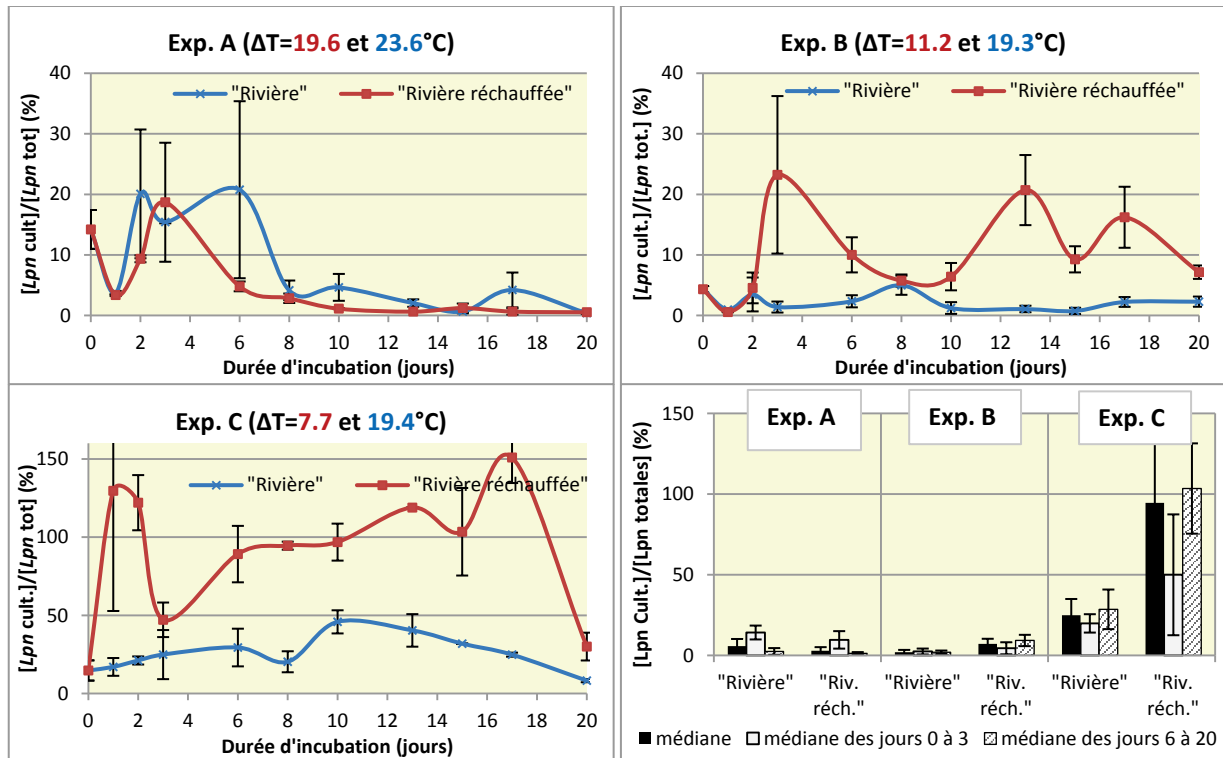


Figure 193 : Evolution de la proportion de *Lpn* présentes à l'état cultivable dans le biofilm au cours de l'incubation ($Lpn_{cultivables}/Lpn_{totales}$) en fonction de la température de l'eau recevant les biofilms. Valeurs médianes des proportions de *Lpn* présentes à l'état cultivable pour l'ensemble du suivi, pour la période réunissant les 3 premiers jours, pour la période allant du sixième au vingtième jour ("Riv. réch." : "Rivière réchauffée"). Les barres d'erreurs correspondent au MAD.

La plus petite diminution de température a donc un effet sur la concentration et la proportion de $Lpn_{cultivables}$. Cet effet de la température semble se maintenir jusqu'au refroidissement intermédiaire, c'est-à-dire le refroidissement de 11.2°C. Le refroidissement de 11.2°C représente la valeur limite jusqu'à laquelle un refroidissement de température engendre un effet sur $Lpn_{cultivables}$ (à la fois sur sa concentration et sa proportion).

En toute logique, la forme cultivable de *Lpn* est donc plus sensible à l'augmentation de température que l'ensemble de *Lpn*.

8.5 Concentrations de protistes

Contrairement à ce qui a été observé pour les descripteurs de la communauté bactérienne, les plus faibles diminutions de température semblent avoir pour effet de lisser la variabilité des concentrations de protistes (Tableau 119).

Tableau 119 : Variabilité (MAD/Médiane) inter-date des données des concentrations de protistes.

	"Rivière"	"Rivière réchauffée"
Exp. A	31%	21%
Exp. B	50%	35%
Exp. C	37%	13%

Dans le même sens et pour la plupart des dates, la dispersion des valeurs est plus faible (homogénéité des répliquats) dans les réacteurs "Rivière réchauffée" que dans les réacteurs "Rivière" (Tableau 120).

Tableau 120 : Variabilité (MAD/Médiane) inter-répliquats pour les concentrations des protistes.

	Exp. A		Exp. B		Exp. C	
	"Rivière"	"Rivière réchauffée"	"Rivière"	"Rivière réchauffée"	"Rivière"	"Rivière réchauffée"
J0	1%	1%	10%	10%	19%	19%
J1	14%	0%	47%	2%	4%	35%
J2	0%	4%	19%	3%	46%	10%
J3	23%	22%	23%	17%	37%	11%
J6	46%	18%	5%	5%	11%	4%
J8	11%	9%	37%	4%	22%	4%
J10	18%	64%	18%	4%	12%	4%
J13	37%	34%	10%	7%	22%	0%
J15	50%	4%	15%	31%	50%	18%
J17	26%	2%	14%	9%	34%	0%
J20	26%	3%	9%	22%	29%	10%

La température n'a pas d'effet marqué sur les concentrations de l'ensemble des protistes comme c'était le cas précédemment avec les concentrations des bactéries_{totales} (Figure 194).

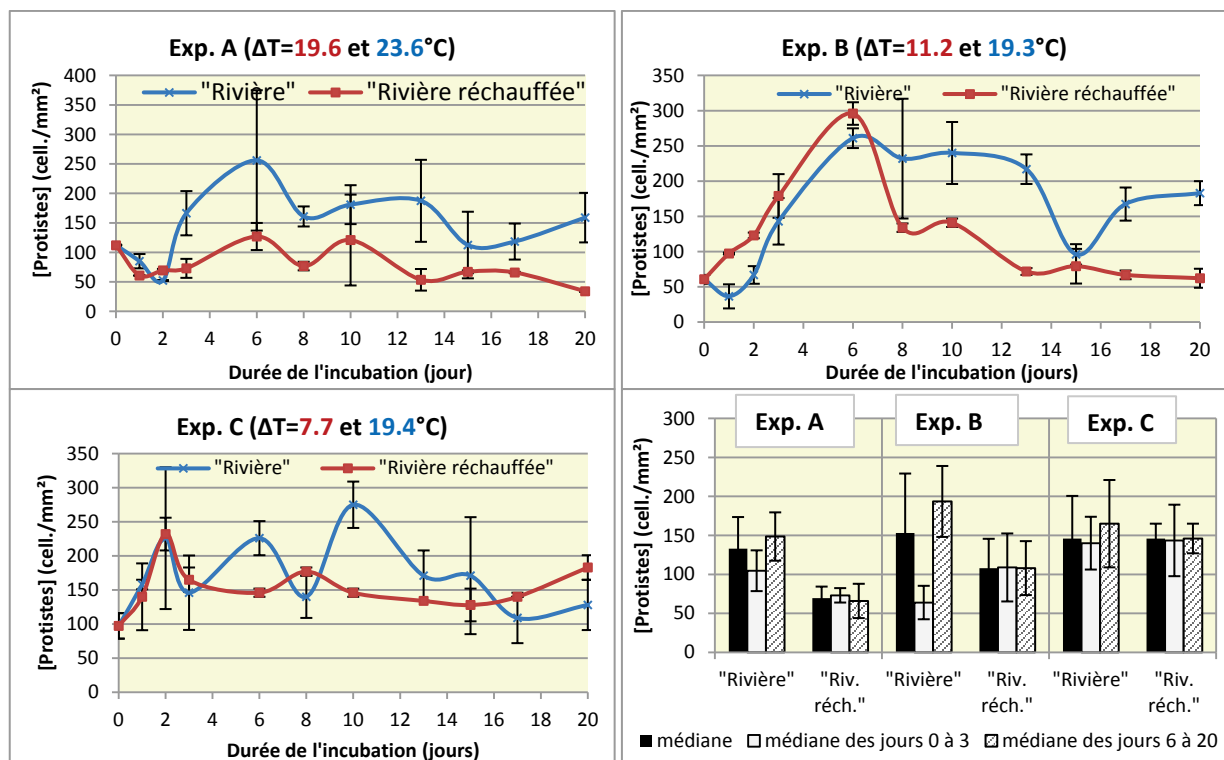


Figure 194 : Evolution de la concentration des protistes dans le biofilm au cours de l'incubation en fonction de la température de l'eau recevant les biofilms. Valeurs médianes des proportions des protistes pour l'ensemble du suivi, pour la période réunissant les 3 premiers jours, pour la période allant du sixième au vingtième jour ("Riv. réch." : "Rivière réchauffée"). Les barres d'erreurs correspondent au MAD.

L'évolution des concentrations de protistes est similaire au cours des premiers jours de l'incubation dans les biofilms subissant chacun des deux refroidissements (à l'exception du jour 2 de l'expérience B). Dans les jours suivants, les biofilms "Rivière réchauffée" présentent généralement des concentrations en protistes légèrement inférieures à celles des biofilms "Rivière". Cette différence est significative au cours de nombreuses dates pour les deux premiers essais mais elle ne l'est à aucune date pour le troisième essai.

L'importance du refroidissement n'a aucune influence sur la concentration des protistes considérés dans leur ensemble. Par contre, la diminution du refroidissement semble tout à la fois, lisser la variabilité des concentrations entre les dates et réduire la dispersion entre les réplicats. Il est possible que ce résultat soit un artéfact, le bac de chauffe jouant le rôle de réservoir tampon dans lequel se produit une homogénéisation des protistes libres avant leur distribution dans les réacteurs proprement dits. C'est alors du fait du renouvellement de l'eau circulante que la communauté des protistes inféodés aux biofilms verrait ses variations lissées.

8.5.1 Concentrations des ciliés

En raison du nombre très réduit de ciliés dans les biofilms, l'hétérogénéité entre les réplicats de ce descripteur est très forte, elle est souvent supérieure à 50% et atteint même régulièrement 100%. Il n'est donc pas possible de considérer cette hétérogénéité comme descripteur de l'effet de la température de l'eau.

Les ciliés sont absents des biofilms à J0. La bêche de rejet ne semble pas favorable à leur présence. Ils sont ensuite apportés par la Chaudanne lors de l'alimentation des réacteurs. Leur concentration reste alors faible tout au long de la période considérée. Elle est généralement inférieure à 20 ciliés/mm² (Figure 195).

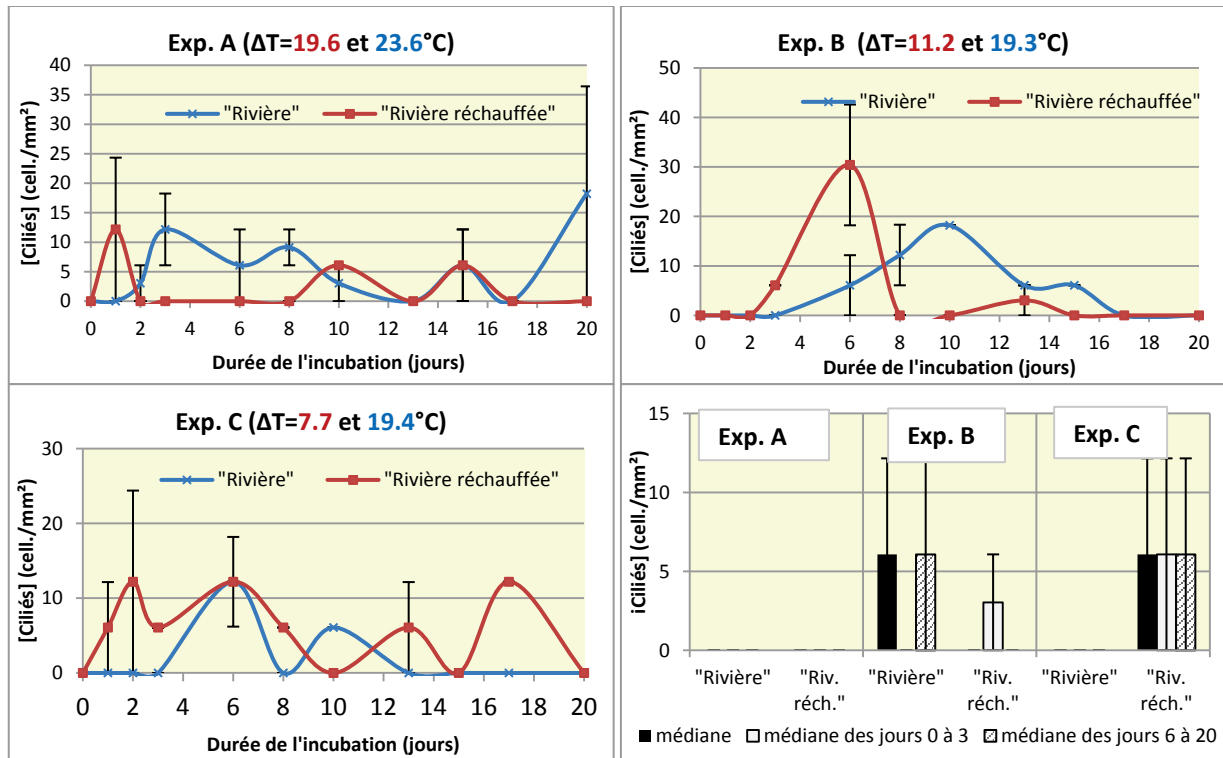


Figure 195 : Evolution de la concentration en ciliés au cours de l'incubation des biofilms en fonction de la température de l'eau recevant les biofilms. Valeurs médianes des concentrations en ciliés pour l'ensemble du suivi, pour la période réunissant les 3 premiers jours, pour la période allant du sixième au vingtième jour ("Riv. réch." : "Rivière réchauffée"). Les barres d'erreurs correspondent au MAD.

Les très faibles effectifs de ces organismes rendent difficile l'interprétation des résultats obtenus. Il semble toutefois, et d'une manière générale, que les variations de la température de l'eau n'influencent pas les concentrations en ciliés.

8.5.2 Concentrations d'amibes

Lorsque l'on considère uniquement les amibes, il n'est pas possible de mettre en évidence d'effet de la température sur l'homogénéité de leur concentration au sein du biofilm que ce soit entre les réplicats ou tout au long du suivi (Tableau 121 et Tableau 122).

Tableau 121 : Variabilité (MAD/Médiane) inter-date des données des concentrations d'amibes.

	"Rivière"	"Rivière réchauffée"
Exp. A	30%	25%
Exp. B	34%	28%
Exp. C	20%	25%

Tableau 122 : Variabilité (MAD/Médiane) inter-réplicats pour les concentrations d'amibes.

	Exp. A		Exp. B		Exp. C	
	"Rivière"	"Rivière réchauffée"	"Rivière"	"Rivière réchauffée"	"Rivière"	"Rivière réchauffée"
J0	8%	8%	20%	20%	19%	19%
J1	14%	25%	33%	8%	5%	7%
J2	17%	12%	60%	12%	21%	0%
J3	3%	11%	8%	26%	27%	9%
J6	25%	14%	0%	3%	6%	16%
J8	38%	12%	27%	10%	16%	5%
J10	13%	40%	15%	9%	36%	5%
J13	16%	29%	4%	0%	0%	8%
J15	14%	0%	21%	11%	8%	15%
J17	14%	33%	19%	20%	12%	0%
J20	6%	33%	10%	13%	0%	23%

Les amibes sont présentes dans les biofilms à une concentration supérieure à celles des ciliés. Le rôle des amibes comme réservoir de *Lpn* dans les biofilms, donne d'autant plus d'importance à l'étude des concentrations de ces organismes. On compte entre 50 et 100 amibes/mm² de biofilm au début de chacune des expérimentations (Figure 196).

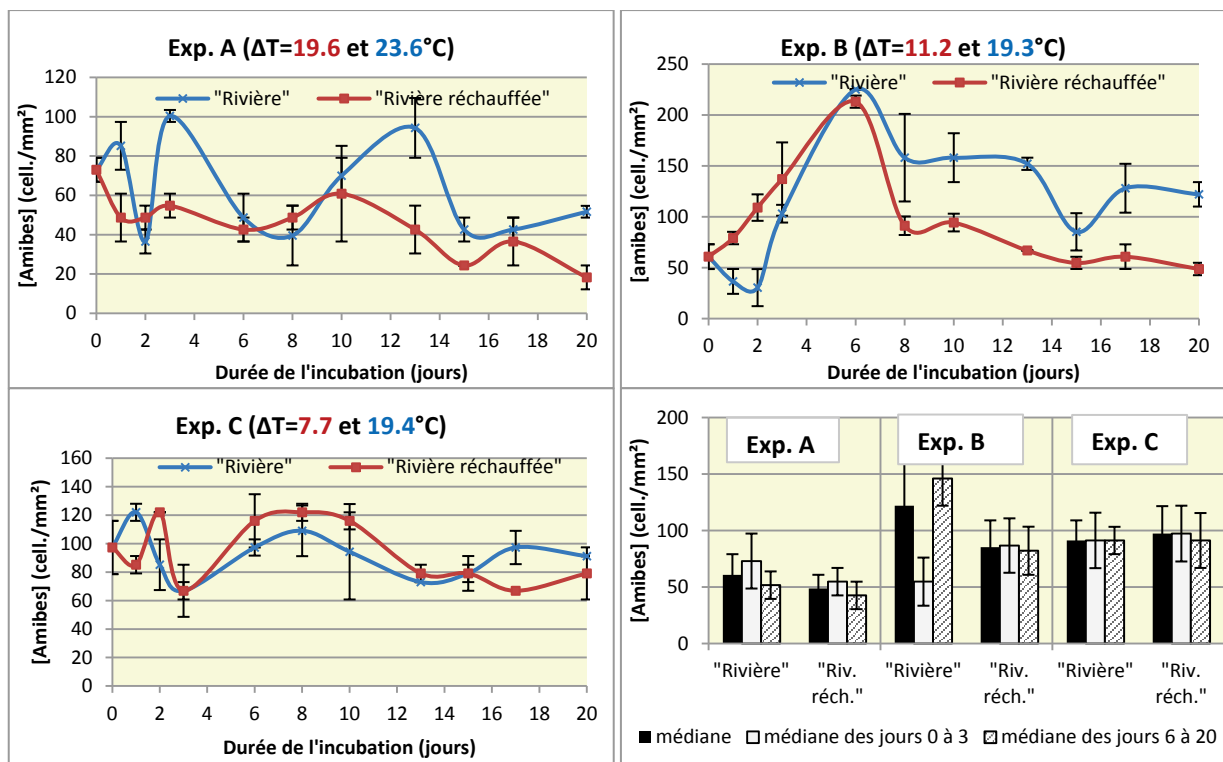


Figure 196 : Evolution de la concentration en amibes au cours de l'incubation des biofilms en fonction de la température de l'eau recevant les biofilms. Valeurs médianes des concentrations en amibes pour l'ensemble du suivi, pour la période réunissant les 3 premiers jours, pour la période allant du sixième au vingtième jour ("Riv. réch." : "Rivière réchauffée"). Les barres d'erreurs correspondent au MAD.

Seul le premier test montre une légère diminution de la concentration des amibes au cours du suivi. Dans tous les autres cas, la concentration des amibes est équivalente au premier et dernier jour de l'étude. Les oscillations sont généralement simultanées quel que soit le type de biofilm suivi, et peut donc refléter les différents apports de la rivière.

Seule l'expérience B semble montrer un effet de la température allant dans le sens d'une augmentation de la concentration des amibes lorsque le refroidissement est le plus important. Ceci peut s'expliquer, pour les biofilms "Rivière réchauffée", par l'éclatement des amibes lors de la libération de *Lpn*. Mais ce résultat ne se confirme pas lors du refroidissement le plus faible, au cours duquel aucune différence significative n'est observée entre les biofilms "Rivière" et "Rivière réchauffée".

Nos résultats montrent que les concentrations des amibes dans les biofilms ne dépendent pas de la température de l'eau (dans la gamme des températures testées), mais, plus probablement, de leur concentration dans l'eau qui alimente les réacteurs. Ces derniers présentent des conditions favorables à l'implantation des amibes en termes d'hydrodynamique et de multiplicité des supports. Ils constituent donc des attracteurs pour ces microorganismes qui ne trouvent pas dans l'eau libre des conditions favorables. Sous cette hypothèse, les augmentations de concentration observées dans les biofilms correspondraient à des phases de colonisation et les baisses, à des phases de lyse en liaison avec la multiplication des légionelles.

8.5.3 Concentrations des flagellés

Là encore, en raison de leurs faibles concentrations, les flagellés sont présents dans les biofilms de manière très hétérogène, ce qui peut également expliquer l'amplitude qui existe autour de la valeur médiane tout au long des 20 jours des suivis (Tableau 123 et Tableau 124). La baisse de la température de l'eau ne permet pas d'améliorer l'homogénéité de ce descripteur.

Tableau 123 : Variabilité (MAD/Médiane) inter-date des données des concentrations de flagellés.

	"Rivière"	"Rivière réchauffée"
Exp. A	68%	75%
Exp. B	100%	100%
Exp. C	100%	50%

Tableau 124 : Variabilité (MAD/Médiane) inter-réplicats des concentrations de flagellés.

	Exp. A		Exp. B		Exp. C	
	"Rivière"	"Rivière réchauffée"	"Rivière"	"Rivière réchauffée"	"Rivière"	"Rivière réchauffée"
J0	0%	0%	0%	0%	0%	0%
J1	0%	0%	0%	100%	0%	0%
J2	0%	67%	100%	50%	50%	67%
J3	64%	0%	75%	100%	60%	17%
J6	56%	100%	50%	5%	11%	33%
J8	4%	17%	50%	100%	25%	25%
J10	36%	100%	55%	0%	70%	33%
J13	58%	0%	25%	100%	57%	0%
J15	69%	29%	0%	67%	100%	0%
J17	48%	17%	60%	25%	0%	20%
J20	23%	33%	60%	0%	50%	30%

Au cours de ce suivi, aucun flagellé pigmenté n'a pu être dénombré, tous les flagellés présents sont donc hétérotrophes (Figure 197). Les précédents volets ont d'ailleurs montré que les flagellés pigmentés sont généralement rares dans les biofilms des différents affluents du lac ainsi que du réseau aixois lui-même. De plus, l'absence de lumière dans la bache où est effectué le développement initial des biofilms mais également dans la galerie où est effectué le suivi ne favorise pas ce type d'organismes photosynthétiques.

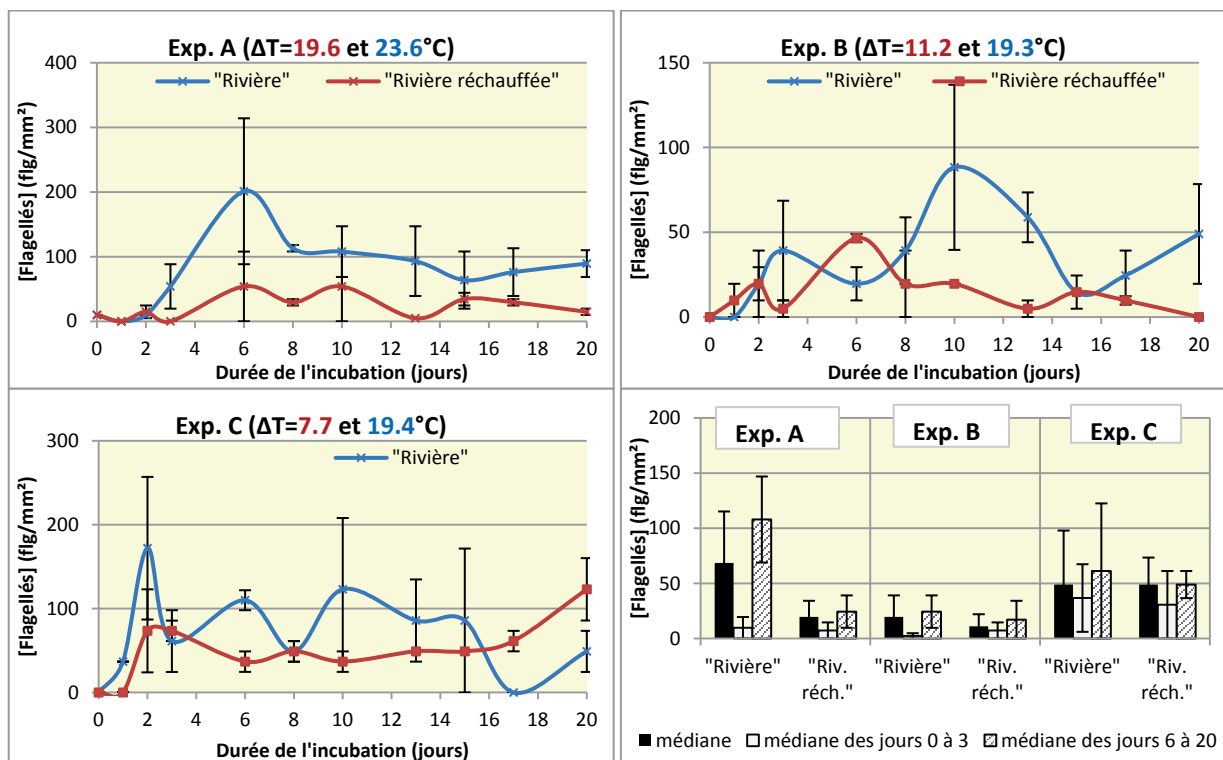


Figure 197 : Evolution de la concentration en flagellés au cours de l'incubation des biofilms en fonction de la température de l'eau. Valeurs médianes des concentrations en flagellés pour l'ensemble du suivi, pour la période réunissant les 3 premiers jours et pour la période allant du sixième au vingtième jour ("Riv. réch." : "Rivière réchauffée"). Les barres d'erreurs correspondent au MAD.

Comme les ciliés, les flagellés sont rares à J0. On en dénombre moins de 10 cell./mm² lors du passage des lames dans les réacteurs au cours du premier essai, ils sont ensuite absents des deux essais suivants.

A l'exception des derniers jours du suivi lors de la première expérience, pour lesquels on dénombre moins de flagellés dans les biofilms soumis à un refroidissement inférieur ($\Delta Q=19.6^{\circ}\text{C}$), les autres expériences ne montrent pas de différence significative dans les concentrations en flagellés entre les biofilms "Rivière" et "Rivière réchauffée".

L'expérience montre tout d'abord que les flagellés apportés par l'eau alimentant les réacteurs peuvent non seulement coloniser les biofilms en formation sur les substrats artificiels, mais aussi se développer ultérieurement.

En ce qui concerne les variations de la température les résultats montrent qu'elle n'a aucune influence statistiquement significative sur la concentration des flagellés.

8.5.4 Importances relatives des différents groupes de protistes

L'importance relative de chaque groupes de protistes au sein de la communauté eucaryote a également est calculée pour chaque jour de chaque suivi (Figure 198). Les tests de Mann-Whitney montrent peu de différences significatives entre les biofilms témoins et essais. Quelques tendances se dégagent tout de même.

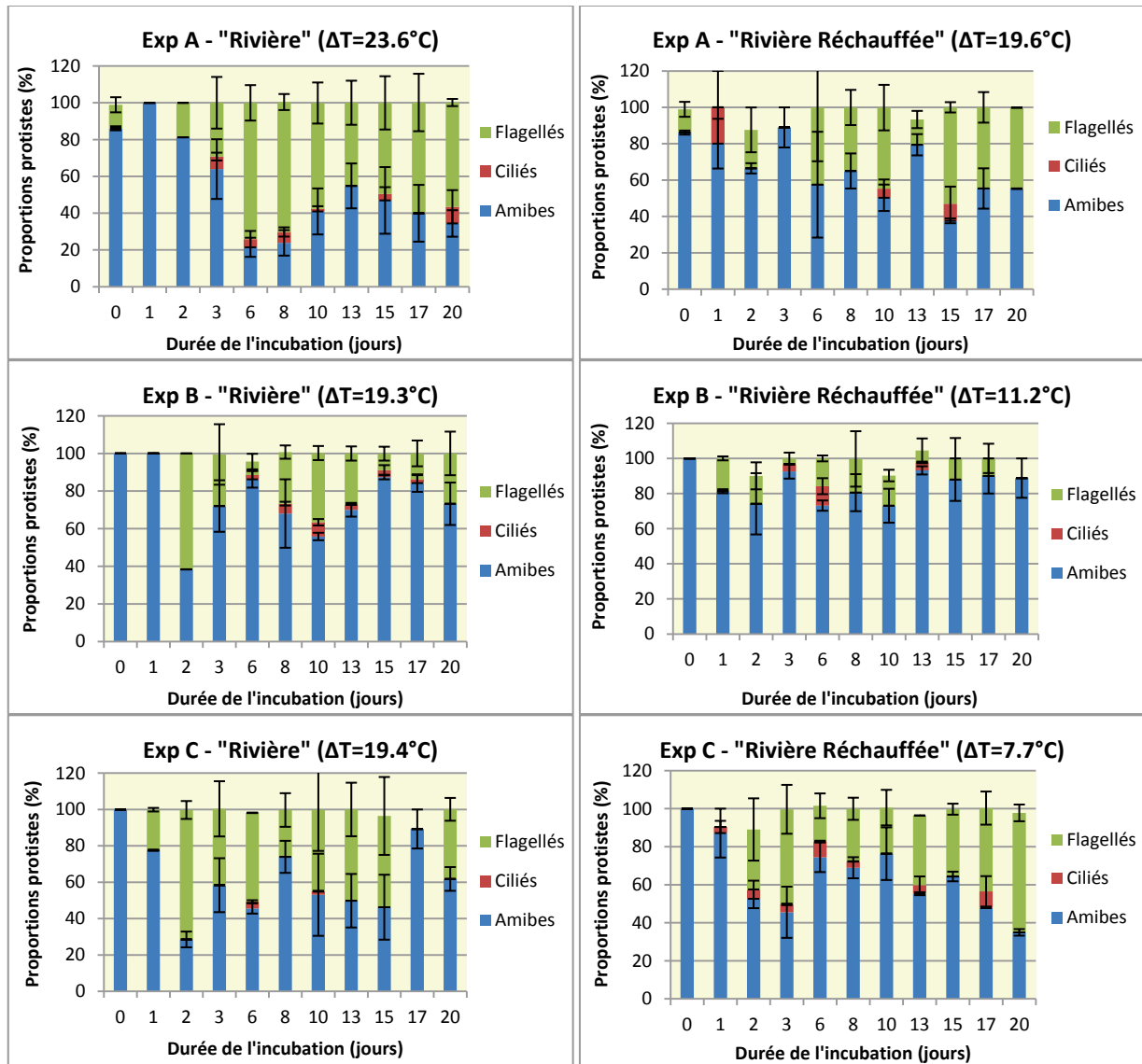


Figure 198 : Proportions relatives des 3 groupes de protistes au cours de la période d'incubation dans les réacteurs "Rivière" (à gauche) et "Rivière réchauffée" (à droite) pour les 3 expériences (les amibes sont représentées en bleu, les ciliés en rouge et les flagellés en vert). Les barres d'erreurs correspondent au MAD.

D'une manière générale à J0, la communauté eucaryote est presque intégralement constituée d'amibes. Les ciliés et flagellés sont ensuite apportés au biofilm, dès les premiers jours de l'incubation, par l'eau de la Chaudanne qui alimente les réacteurs. Au cours des suivis A et C, après quelques jours d'incubation, les flagellés prennent une part plus importante que les amibes dans la communauté eucaryote du biofilm. Ce changement peut s'expliquer par la lyse des amibes consécutive à la multiplication intra-cellulaire de *Lpn*. On constate que ce phénomène est généralement plus important dans les réacteurs "Rivière" que dans les réacteurs "Rivière réchauffée".

Lors de l'expérience A, la tendance initiale s'inverse à partir du sixième jour dans les biofilms "Rivière", les flagellés deviennent plus nombreux que les amibes. Dans le cas des biofilms "Rivière réchauffée", la proportion de flagellés augmente également au cours de l'incubation, à l'exception des jours 3 et 13. Mais les biofilms prélevés aux jours 6 et 15 présentent une majorité de flagellés. Dans tous les autres cas, les eucaryotes contiennent majoritairement des amibes. Cette première diminution du refroidissement (4°C), semble donc favoriser les amibes au détriment des flagellés.

Au cours de l'**expérience B**, les amibes sont les seuls protistes présents à J0. Les flagellés apparaissent ensuite à partir du premier ou deuxième jour après le passage des biofilms dans les réacteurs. Là encore, la diminution du refroidissement, ici de 8°C, conduit à une diminution des flagellés au profit des amibes.

La même observation est effectuée jusqu'au 12^{ème} jour du suivi pour l'écart de température de 12°C (**Expérience C**). Mais la baisse de la proportion de flagellés ne semble pas être en liaison avec l'importance du changement de température. Lors des derniers jours, la proportion de flagellés est plus importante dans le cas du plus faible refroidissement.

Nos résultats montrent que lorsque la température est responsable d'une modification de l'évolution de la structure de la communauté de protistes au cours de l'incubation, l'importance des flagellés diminue et de ce fait, la prépondérance des amibes est accentuée (la proportion de ciliés étant négligeable).

La plupart de nos observations va à l'encontre d'une observation effectuée par Hunt *et al.* (1998) pour qui les flagellés sont les principaux composants de la communauté eucaryote du biofilm et sont les organismes les plus nombreux dans les biofilms immédiatement après les bactéries dans des biofilms développés en rivière sur des galets ou sur des substrats naturels (papier de verre).

Nos résultats donnent l'exemple d'une participation effective de la température aux conditions environnementales auxquelles la structure de la communauté eucaryote semble particulièrement sensible.

8.6 Recherche de corrélations entre les descripteurs

Une recherche de corrélation est tout d'abord effectuée à l'aide du coefficient τ de Kendall (Tableau 125). Les corrélations concernent l'ensemble des descripteurs présentés ci-dessus (concentrations et proportions) considérés deux-à-deux. Dans les cas des proportions, la corrélation n'est conservée que si elle implique un descripteur différent des autres termes ayant permis le calcul du rapport. Dans un premier temps, la recherche de corrélation a été effectuée sur l'ensemble du jeu de données. C'est-à-dire pour chaque date des 3 expériences, et les échantillons "Rivière" et "Rivière réchauffée".

Le calcul de ce coefficient confirme les observations précédentes, c'est-à-dire que la température de l'eau a un effet positif sur la concentration de $Lpn_{cultivables}$ et sur leur proportion, ainsi que sur la proportion d'amibes. A l'inverse les eaux plus chaudes sont défavorables aux flagellés.

On remarque également que les concentrations des différents groupes de protistes sont corrélées avec les concentrations en bactéries_{totales} et en bactéries_{cultivables}.

Tableau 125 : Corrélations significatives entre les descripteurs obtenus par le calcul du τ de Kendall, sur l'ensemble des données (les 3 expériences (A,B,C), les échantillons "Rivière" et "Rivière réchauffée" à chaque date de prélèvement (0 à 20)) de tous les descripteurs considérés deux-à-deux

Corrélations positives	Corrélations négatives
Température – Lpn cultivables Température - % Lpn cultivables Température - % amibes	Température – Flagellés Température - % flagellés
Lpn cultivables - Bactéries totales Lpn cultivables – Amibes % Lpn cultivables - Bactéries totales % Lpn cultivables – Protistes % Lpn cultivables – Amibes	Lpn totales - Bactéries totales Lpn totales - Protistes Lpn cultivables - % Lpn totales Lpn cultivables - % bactéries cultivables % Lpn totales - Protistes % Lpn totales – Lpn cultivables % Lpn totales – Flagellés % Lpn totales – Amibes % Lpn cultivables - % bactéries cultivables
Bactéries totales – Amibes Bactéries totales – Protistes Bactéries totales – Flagellés Bactéries cultivables – Amibes Bactéries cultivables – Protistes Bactéries cultivables – Ciliés	
Flagellés - Ciliés Flagellés - % ciliés	Ciliés - % amibes Flagellés - % amibes % amibes - % flagellés % amibes - % ciliés

Les ciliés étant rares au sein de nos biofilms, la communauté eucaryote des biofilms est presque exclusivement composée d'amibes et de flagellés. Ceci explique la corrélation très forte entre les proportions d'amibes et celles des flagellés. Cette corrélation qui implique une proportion entre deux termes seulement ne peut donc pas être prise en considération.

En raison du décalage dans le temps entre les trois écarts de température, l'eau utilisée pour ces 3 expérimentations peut différer sur des paramètres autres que la température de départ (concentrations ioniques et de matière organique par exemple). Malheureusement, seule la température a été suivie dans ce volet. Les organismes présents dans l'eau alimentant les réacteurs pourraient expliquer certaines de ces variations entre les expériences, tout comme la composition plus précise du biofilm de départ. En effet, lorsque les graphiques représentant les descripteurs corrélés sont tracés, c'est souvent la troisième expérience qui se distingue des autres et qui de ce fait, contribue à la visualisation graphique d'une relation entre certains des descripteurs (Figure 199).

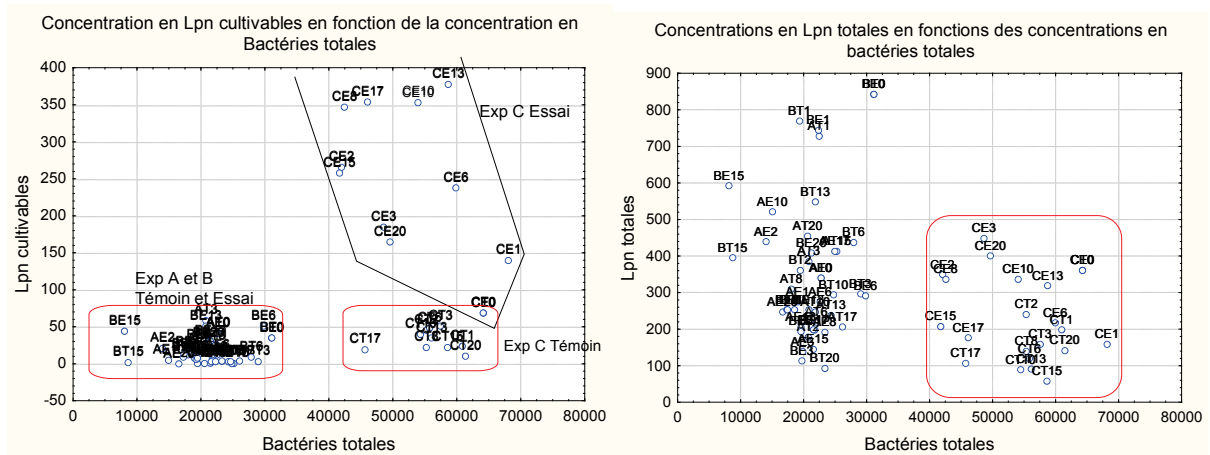


Figure 199 : Relation entre les concentrations en *Lpn* sous différents états physiologiques (cultivables ou totales) et la concentration en bactéries_{totales} (DAPI) sur l'ensemble des données (n=60) : les 3 expériences (A,B,C), les échantillons "Rivière" (témoins, T) et "Rivière réchauffée" (essais, E) à chaque date de prélèvement (0 à 20).

A la vue de ces résultats, et du fait de la différence de température variable entre les 3 expériences, la recherche de corrélation a ensuite été effectuée à l'intérieur même de chaque expérimentation (Tableau 126).

Tableau 126 : Corrélations significatives obtenues au sein de chacune des expérimentations pour l'ensemble des dates et les échantillons témoins et essais ; en considérant tous les descripteurs deux-à-deux

	Corrélations positives	Corrélations négatives
Exp. A	Température - % amibes $Lpn_{\text{cultivables}}$ - Amibes Ciliés - Flagellés % bactéries $_{\text{cultivables}}$ - % $Lpn_{\text{cultivables}}$	Température - Ciliés Température - Flagellés Température - Protistes Température - % flagellés Ciliés - % amibes Flagellés - % amibes % amibes - % ciliés % amibes - % flagellés
Exp. B	Température - $Lpn_{\text{cultivables}}$ Température - % $Lpn_{\text{cultivables}}$ Bactéries $_{\text{cultivables}}$ - Amibes Bactéries $_{\text{cultivables}}$ - Ciliés Bactéries $_{\text{cultivables}}$ - Flagellés Bactéries $_{\text{cultivables}}$ - Protistes Bactéries $_{\text{cultivables}}$ - % ciliés Bactéries $_{\text{cultivables}}$ - % flagellés Amibes - Ciliés Amibes - Flagellés Amibes - % bactéries $_{\text{cultivables}}$ Amibes - % ciliés Ciliés - Flagellés Ciliés - % bactéries $_{\text{cultivables}}$ Flagellés - % bactéries $_{\text{cultivables}}$ Flagellés - % ciliés Protistes - % bactéries $_{\text{cultivables}}$ % bactéries $_{\text{cultivables}}$ - % ciliés % bactéries $_{\text{cultivables}}$ - % flagellés	Température - Bactéries $_{\text{cultivables}}$ Température - Flagellés Température - % bactéries $_{\text{cultivables}}$ Lpn_{totales} - Flagellés Lpn_{totales} - Protistes Bactéries $_{\text{cultivables}}$ - % amibes $Lpn_{\text{cultivables}}$ - Flagellés $Lpn_{\text{cultivables}}$ - % Flagellés Flagellés - % amibes Protistes - % Lpn_{totales} % bactéries $_{\text{cultivables}}$ - % amibes % amibes - % flagellés
Exp. C	Température - Lpn_{totales} Température - $Lpn_{\text{cultivables}}$ Température - Ciliés Température - % Lpn_{totales} Température - % $Lpn_{\text{cultivables}}$ Température - % Ciliés Lpn_{totales} - $Lpn_{\text{cultivables}}$ $Lpn_{\text{cultivables}}$ - Ciliés $Lpn_{\text{cultivables}}$ - % Lpn_{totales} $Lpn_{\text{cultivables}}$ - % Ciliés Amibes - % bactéries $_{\text{cultivables}}$ % $Lpn_{\text{cultivables}}$ - % ciliés	Bactéries totales - % $Lpn_{\text{cultivables}}$ Amibes - % flagellés % amibes - % ciliés

Lors de la **première expérience**, la température est uniquement corrélée avec les populations de protistes (concentrations et proportions). Mais elle favorise uniquement les amibes, tandis que la corrélation est négative avec les ciliés d'une part et les flagellés d'autre part. Les autres corrélations concernent presque qu'exclusivement les différentes familles de protistes. La concentration des $Lpn_{\text{cultivables}}$ est positivement corrélée avec les concentrations des amibes. Quand à la proportion de $Lpn_{\text{cultivables}}$ c'est avec la proportion de bactéries $_{\text{cultivables}}$ qu'existe une corrélation positive.

Au cours de la **deuxième expérience**, de plus nombreuses corrélations sont mises en évidence. La température reste négativement corrélée avec les concentrations en flagellés, mais la corrélation disparaît si l'on considère les autres groupes de protistes. Elle est également corrélée avec la concentration des bactéries_{cultivables} ainsi qu'avec leur proportion. Mais cette corrélation entre la température et les bactéries_{cultivables} ne se confirme pas lors de la troisième expérimentation. La température est positivement corrélée aux concentrations et aux proportions de $Lpn_{cultivables}$. Ces corrélations se confirment ensuite lors de la **troisième expérimentation** auxquelles s'ajoutent des corrélations avec la concentration de $Lpn_{totales}$ ainsi que leurs proportions. Ceci confirme les observations effectuées précédemment.

Les corrélations entre les concentrations des différents types de protistes sont positives. Les protistes sont les descripteurs qui présentent le plus de corrélations, que ce soit entre eux, mais également avec les concentrations des bactéries_{cultivables}, de $Lpn_{totales}$, ou les proportions de bactéries_{cultivables}. Les conditions qui sont favorables au maintien et au développement des bactéries dans leur état cultivables sont donc les mêmes qui permettent à la communauté eucaryote de se développer. A l'inverse, plus les protistes sont nombreux, moins les Lpn sont importantes dans la communauté bactériennes.

Enfin, si l'on considère les valeurs médianes de l'ensemble de chaque suivi, seuls deux couples de descripteurs montrent une corrélation significative: les concentrations des bactéries_{cultivables} avec les concentrations des amibes d'une part et les concentrations des bactéries_{cultivables} et les concentrations des protistes d'autre part (Figure 200). Les coefficients de Kendall sont respectivement de 0.87 et de 0.83. De plus, la corrélation est quasi-linéaire avec les amibes, tandis que d'une manière générale la concentration en protistes n'augmente qu'à partir d'une concentration seuil des bactéries_{cultivables}. Dans les deux cas, la corrélation est positive ce qui ne va pas dans le sens d'une consommation des bactéries_{cultivables} présentes dans le biofilm par les protistes qu'il contient, mais plutôt d'une consommation de bactéries de la colonne d'eau par les protistes du biofilm comme cela a déjà pu être montré dans la littérature (Hunt & Parry, 1998).

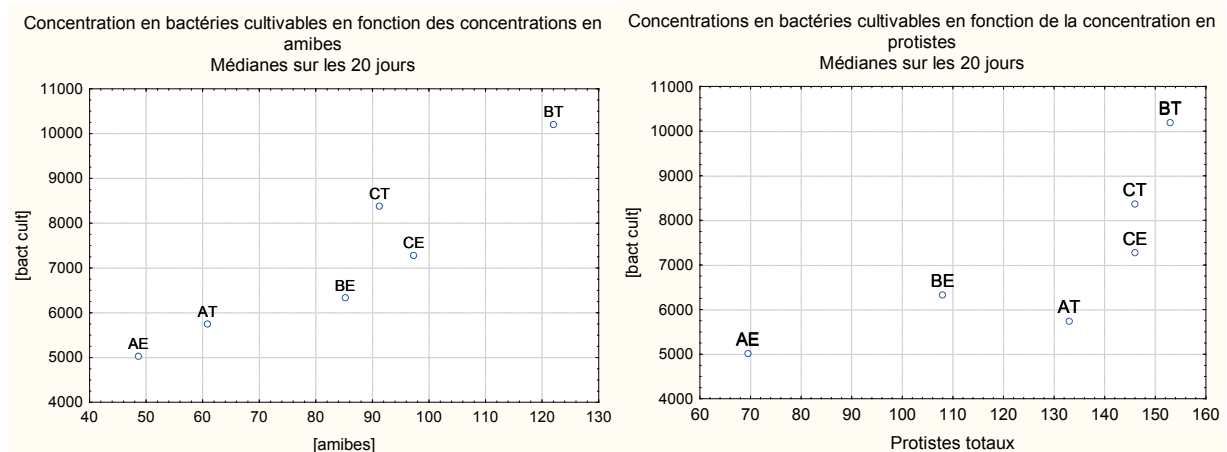


Figure 200 : Relation entre les concentrations de bactéries_{cultivables} et les concentrations de protistes et plus précisément d'amibes Conclusions sur l'effet de la température lorsque que l'on considère la valeur médiane obtenue sur l'ensemble des 20 jours de suivis dans le cas des échantillons témoins et essais des 3 expériences (AT : Exp A-Témoin ; AE : Exp A-Essai; BT : Exp B-Témoin ; BE : Exp B-Essai ; CT : Exp C-Témoin ; CE : Exp C-Essai ; n=6)

8.7 Conclusions sur l'effet de la température

Au cours de cette étude effectuée grâce aux réacteurs, nous avons pu suivre l'évolution de biofilms développés en eaux thermales en fonction de la température de l'eau.

Aucune des 3 différences de température testées n'a d'influence sur les concentrations des bactéries_{totales}, des bactéries_{cultivables} ni des protistes. Par contre, un changement des proportions d'amibes et de flagellés a été enregistré.

A l'inverse, on peut voir que la température de l'eau a une influence sur les concentrations et les proportions de *Lpn*. Le refroidissement permettant l'augmentation de la concentration de *Lpn*_{totales} ($\Delta T \leq 7.7^\circ\text{C}$, eau réceptrice $> 27.3^\circ\text{C}$) est inférieur à celui conduisant à l'augmentation de la concentration de *Lpn*_{cultivables} ($\Delta T \leq 11.2^\circ\text{C}$, eau réceptrice $> 23.8^\circ\text{C}$).

Nos résultats sont en accord avec les observations d'(Ohno, *et al.*, 2003) qui n'observe pas de perte de la cultivabilité de *Lpn* lors d'une incubation en mésocosmes alimentés en eau thermales à une température de 25°C . A l'inverse, de précédentes observation en mésocosmes alimentés par de l'eau de rivière montraient une baisse de la cultivabilité de *Lpn* à une température de 26°C , malgré un maintien de l'activité métabolique pour une longue période (Paszko-Kolva, *et al.*, 1993, Borella, *et al.*, 2005).

Il est important de constater que parmi les températures testées, même les plus basses permettent le maintien de *Lpn* dans les biofilms. Ainsi, lorsque des fragments de biofilms sont apportés par les eaux thermales dans le réseau Aixois, les *Lpn* présentes dans ces fragments ne seront pas être éliminées par le seul effet de la différence de température entre l'eau thermique et le cours d'eau récepteur. De plus, en fonction de la température de l'eau et donc de la saison, les différentes formes de *Lpn* peuvent se multiplier au sein de ce milieu récepteur.

***9 - Modélisation du transport
de Lpn vers le lac en fonction
des conditions
météorologiques***

Le modèle construit au cours de cette étude cherche à mettre en évidence des périodes dites « de risques » correspondant à un apport soutenu de *Lpn* en direction de la plage d'Aix-les-Bains à la suite d'épisodes orageux. Ce modèle ne concerne que la saison estivale (de mai à septembre inclus) lorsque la plage est ouverte au public. Le modèle devrait constituer un guide vis-à-vis de la mise en route d'un jet d'eau installé au large de la plage d'Aix-les-Bains et alimenté par l'eau du lac elle-même. Le modèle doit permettre, plus précisément, de limiter la mise en marche du jet à des périodes pour lesquelles le risque d'aérosolisation de fortes concentrations de bactéries et parmi elles de *Lpn* est réduit.

La mise au point du modèle s'est effectuée en deux étapes.

La première étape correspond à la modélisation du débit (modèle pluie-débit) et de ses variations dans la partie aval du réseau aixois au cours d'événements orageux en période estivale. La réalisation du modèle a été réalisée par la Sogreah et plus précisément par Guillaume Piton. J'ai d'ailleurs repris ici, en partie, le rapport qui nous a été remis avec le modèle.

La deuxième étape avait pour objectif de déterminer le seuil de débit à partir duquel la charge du cours d'eau augmente en raison de l'arrachage de fragments de biofilms. *Lpn* faisant partie de la communauté bactérienne des biofilms du réseau, cette espèce se retrouve donc également dans les fragments arrachés suite à l'augmentation des forces de cisaillement. La charge de *Lpn* dans la colonne d'eau va donc augmenter en fonction de la charge globale du cours d'eau.

9.1 Réalisation du modèle pluie-débit

La modélisation du débit en fonction de l'intensité des épisodes orageux, concerne la partie basse du réseau hydrographique aixois, uniquement à l'aval de la confluence entre la Chaudanne et le Tillet (Figure 14). Les débits obtenus proviennent des limnigraphes installés sur la Chaudanne. Les données pluviométriques ont été obtenues à l'aide d'un pluviomètre installé sur le massif de la Chambotte dans un premier temps, puis de données acquises par une station gérée par Météo-France située au niveau de l'aérodrome de Voglans (Figure 201).

Les événements pluvieux utilisés pour caler et valider le modèle ont été choisis parmi ceux de l'été 2007.

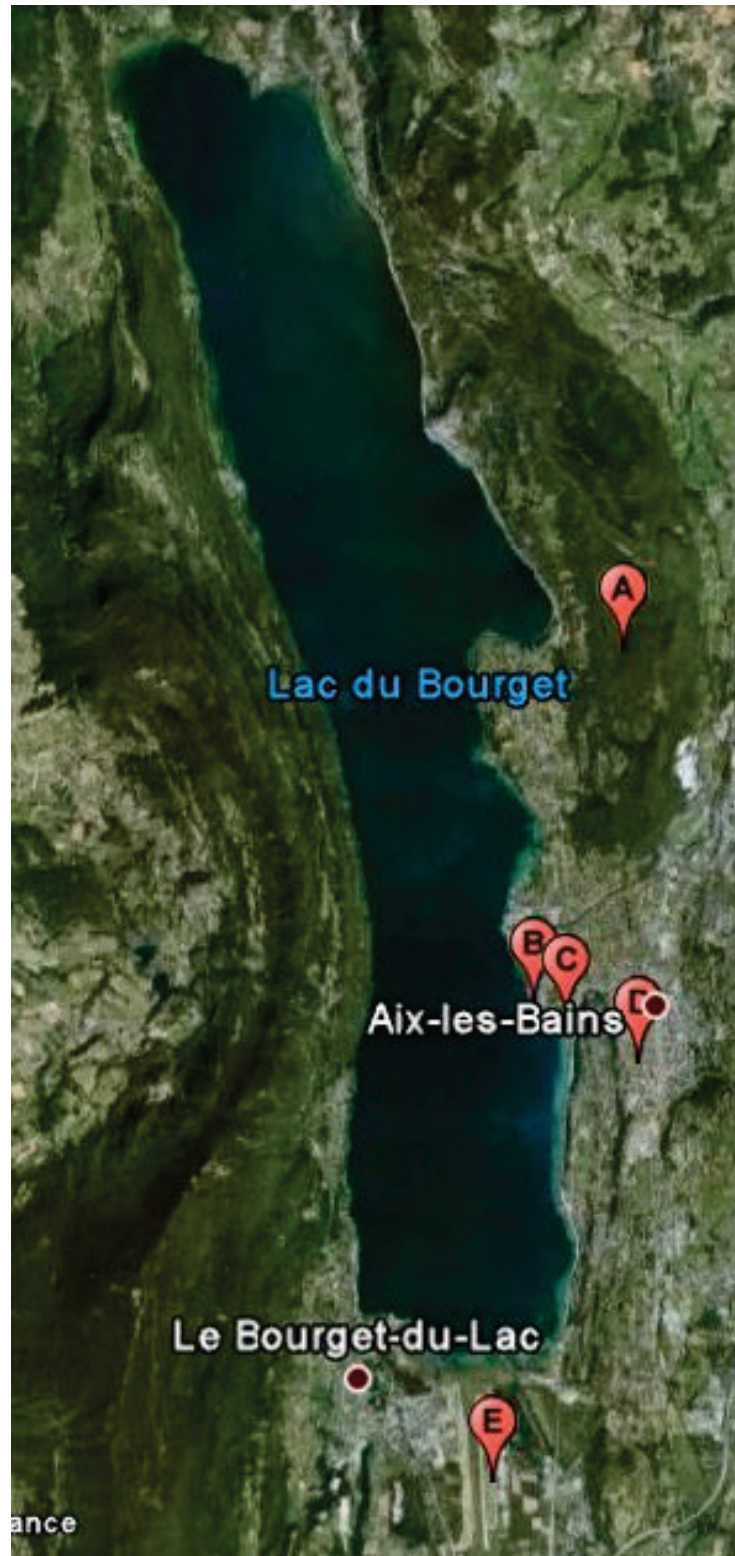


Figure 201 : Emplacements des sites impliqués dans le modèle pluie-débit (Image Google Earth).
A : Massif de la Chambotte, Pluviomètre ; B : Confluence entre la Chaudanne et le Lac ; C : Plage D'Aix-les-Bains et Jet d'eau ; D : Confluence entre le Tillet et la Chaudanne ; E : Pluviomètre de Voglans.

9.1.1 Enregistrement des débits

Sur l'ensemble des stations équipées de limnigraphes (Figure 25), seules les stations Liège et Pêcheur ont été utilisées pour la construction du modèle.

La station Pêcheur permet de modéliser les débits à l'aval de la confluence entre la Chaudanne et le Tillet. Puis grâce à la station Liège, il devient possible de considérer l'importance relative des deux bassins versant (Chaudanne et Tillet) dans le débit mesuré à l'aval de leur confluence, ainsi que leurs réactions suite aux épisodes orageux.

Le choix de la station Pêcheur a été effectué à partir de son emplacement à l'aval de la confluence avec le Tillet. Elle a été préférée à la station Lepic, pourtant plus proche du point de confluence entre la Chaudanne et le Tillet, en raison de la qualité des courbes de tarages obtenues, et, à la station Aquarium, en raison de l'influence possible du niveau du lac à cette station.

La composante du débit expliquée par le Tillet est alors estimée comme la différence entre les débits des deux stations Pêcheur et Liège avec un décalage de 45 min.

$$Q_{\text{Tillet}}(t) = Q_{\text{Pêcheur}}(t) - Q_{\text{Liège}}(t-45\text{min})$$

Ce décalage correspond au temps de transit mesuré sur cette fraction du réseau. Des mesures de temps de transit sur le réseau ont en effet montré que 36 minutes sont nécessaires au transfert entre les stations Liège et Lepic, puis seulement 10 minutes suffisent à parcourir la distance entre les stations Lepic et Pêcheur (Quay, 2009).

9.1.2 Choix des événements orageux

Les données pluviométriques utilisées lors de la construction du modèle ont été enregistrées sur le massif de la Chambotte à proximité de la Grotte aux Fées avec un pas de temps d'enregistrement de 15 minutes. L'enregistrement couvre une période s'étendant du 1 mai 2007 au 1 juillet 2008. L'absence de données après cette date est due à la mise hors service du pluviographe suite à un acte de vandalisme.

Après cette date, les données proviennent de la station Météo-France située à Voglans. Il s'agit de la seule station située à proximité d'Aix-les-Bains dont le pas de temps d'enregistrement est inférieur à la journée. Deux pas de temps sont effectivement disponibles : 1 heure ou 6 minutes.

Le changement de pluviographe a été validé par la comparaison des débits issus de la modélisation de 4 épisodes orageux à partir de ces 2 types de données pluviométriques (cf. paragraphe 9.1.5).

Les événements orageux utilisés pour construire et valider le modèle se sont tous déroulés au cours de l'été 2007, afin de réserver les périodes ultérieures aux essais de modélisation.

Différents événements d'intensité variable ont été choisis pour la construction du modèle. En raison de l'emplacement du pluviomètre sur la Chambotte, l'intensité de ces événements a tout d'abord été comparée à la pluviométrie journalière enregistrée à Aix-les-Bains (données Météo-France) (Tableau 127).

Tableau 127 : Comparaison des données obtenues grâce au pluviomètre de la Chambotte par rapport aux enregistrements journaliers du pluviomètre d'Aix-les-Bains lors de différents épisodes orageux au cours de l'été 2007.

$$\text{Différence relative} = (\text{Pluies Chambotte} - \text{Pluies Aix-les-Bains}) / \text{Pluies Aix-les-Bains} * 100$$

Date	Pluies à Aix les Bains (mm)	Pluies sur la Chambotte (mm)	Différence relative par rapport à Aix les Bains (%)
31/05/2007	30.3	28	-8%
11/06/2007	21.9	16.2	-26%
15/06/2007	23.1	20.4	-12%
17/06/2007	23.1	17.2	-26%
17/09/2007	37.5	29	-23%
27/09/2007	23.8	11.4	-52%
29/09/2007	23.3	20.4	-12%

On remarque que les pluies mesurées à la Chambotte sont inférieures à celles mesurées à Aix-les-Bains. Cette différence est en partie à l'origine d'un décalage entre le résultat final de la modélisation et la réalité. Un tel décalage est assez courant en raison du caractère simplifié des modèles vis-à-vis de la complexité des bassins versants naturels. La pluie du 27 septembre 2007 a été éliminée des événements utilisés pour le calage du modèle en raison, précisément, de la différence trop importante qui existe entre les deux pluviomètres (52%). Il est possible que cet événement soit trop localisé sur Aix-les-Bains pour être mesuré au niveau de la Chambotte. Ce caractère local est courant dans les épisodes orageux, en particulier lorsque l'on s'intéresse à des orages estivaux.

Par conséquent, si un nouveau pluviomètre est installé sur la Chambotte, les résultats de la modélisation auront la précision issue du calage du modèle. Mais si l'installation est faite à Aix-les-Bains même, le modèle surestimera quelque peu les apports au cours d'eau.

9.1.3 Calage du modèle Pluie-Débit

Au cours du calage du modèle différentes constatations ont été effectuées. Comme cela vient d'être évoqué, le décalage observé sur l'intensité des pluies entraîne une certaine incertitude dans le calage du modèle.

De plus, la variabilité des données de débit au niveau de la station Liège est importante. Cette variabilité s'explique à la fois à travers la faible hauteur d'eau à cette station (à proximité de la limite basse de la gamme d'utilisation des limnigraphes) et à travers la dérive du limnigraphe.

Il est alors difficile d'en dégager des données hydrologiques satisfaisantes telles que le débit moyen ou la surface active. Cette surface active (Sa) est la surface, qui pour une pluie de X mm d'eau est caractérisée par un volume écoulé à l'exutoire (V) de $V = X * Sa$ (V en m³).

Afin d'obtenir des résultats satisfaisants au niveau de la station aval, il a alors été nécessaire de fixer le débit de la Chaudanne à une valeur de débit moyen. Toute la réaction hydrologique est alors générée par le Tillet. Il se peut que le limiteur de débit situé au niveau de la bifurcation du Tillet ne joue pas correctement son rôle, mais il est également possible que les débits supérieurs au débit seuil du limiteur s'expliquent par le ruissellement le long de l'hippodrome ou par des apports non déterminés (provenant des Thermes de Marlioz par exemple).

Le fonctionnement du modèle correspond au schéma suivant (Figure 202) :

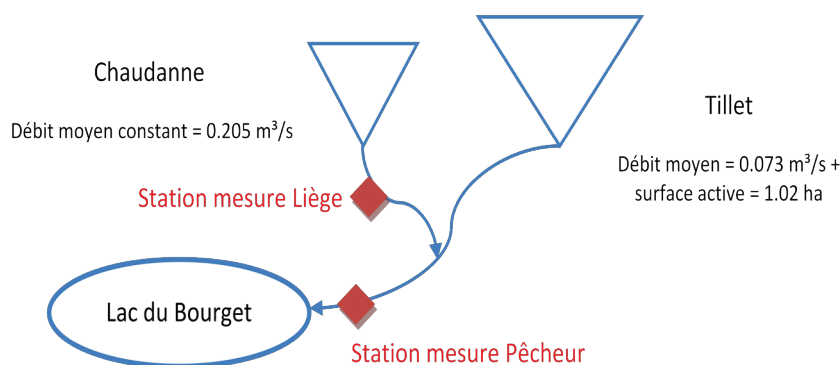


Figure 202 : Schéma de fonctionnement du modèle CANOE.

9.1.4 Validation du calage du modèle

Le modèle a ensuite été validé sur la base de quatre événements pluvieux ayant eu lieu entre le 07 juin 2007 et le 29 août 2007, et qui n'ont pas été impliqués dans le calage du modèle (Tableau 128).

Tableau 128 : Résultats des tests de validation du calage.
Erreur relative = (Valeur calculée-Valeur mesurée)/Valeur mesurée)*100

Événement	Pluie journalière (mm)	Volume de pluie mesuré (m³)	Volume de pluie calculé (m³)	Erreur relative (%)	Débit maximal mesuré (m³/s)	Débit maximal calculé (m³/s)	Erreur relative (%)
07/06/2007	21	31 315	38 732	24%	2.30	3.56	55%
08/08/2007	15	36 710	32 437	-12%	2.60	1.83	-30%
16/08/2007	9	28 630	27 126	-5%	1.47	0.67	-55%
29/08/2007	21	37 610	37 496	0%	1.46	1.76	20%
moyenne				2%			-2%

On remarque que pour un événement ponctuel, le modèle n'est pas très précis. L'erreur du volume de pluie calculé tout au long des 4 événements pluvieux varie en effet de $\pm 25\%$; la différence entre les débits maximums mesurés et calculés est de $\pm 55\%$, ce qui est très élevé.

L'importance de ce décalage peut provenir du pas de temps utilisé. Un pas de temps de 15 minutes peut, en effet, laisser passer le pic de crue d'un épisode orageux rapide et ainsi sous-estimer le débit maximal mesuré.

Par contre, si l'on considère une série d'événements, les résultats sont acceptables avec une erreur relative moyenne sur ces 4 événements de 2% concernant les volumes et de -2% concernant le débit maximal de l'événement.

C'est donc dans une utilisation régulière et non dans une utilisation ponctuelle que le modèle trouve son utilité.

9.1.5 Nouvelle validation du modèle sur la base des pluies de la station météo de Voglans

Cette nouvelle validation a été rendue nécessaire à la suite de l'acte de vandalisme qui a touché la station de la Grotte aux Fées. Nous avons alors dû faire une comparaison des débits mesurés avec les débits simulés à partir des deux jeux de données.

Quatre événements sont utilisés, dont un seul est commun aux événements utilisés durant l'étape précédente de validation du calage du modèle (Tableau 129).

L'aspect local des orages au cours de la période estivale explique les différences de volume des précipitations enregistrées par les deux pluviomètres. En moyenne, les valeurs de pluies diffèrent de seulement 2,5% entre la Chambotte et Voglans, mais la différence peut atteindre 40% comme c'est le cas le 20 août 2007 avec un événement orageux plus localisé sur Voglans que sur la Chambotte.

La différence d'intensité des pluies enregistrées par les deux pluviomètres se ressent sur les résultats issus de la modélisation. Ceci est plus particulièrement vrai pour l'épisode orageux du 20 Août 2007, où l'erreur relative par rapport aux données mesurées passe de 4.6 à 11% pour le volume et de 27.5 à 63% pour le débit maximal lorsque l'on change de pluviomètre.

D'une manière générale, l'effet est plus marqué lorsque l'on considère le débit maximal que lorsque l'on s'intéresse au volume d'eau qui s'écoule au cours de l'épisode orageux. En moyenne sur ces 4 événements, la différence relative par rapport à la valeur mesurée est légèrement inférieure à 4% pour le volume d'eau écoulé, tandis qu'il est supérieur à 10% pour le volume maximal. On note que la modélisation du débit maximal, peut momentanément être très proche de la valeur mesurée avec une erreur de seulement 3.4% le 29 août 2007.

Tableau 129 : Comparaison de l'efficacité de la modélisation en fonction du pluviomètre considéré au cours de 4 événements orageux.

Erreur relative = (Valeur calculée-Valeur mesurée)/Valeur mesurée)*100

Date	Volume Précipitations Voglans (mm)	Volume Précipitations Chambotte (mm)	Différence relative Précipitations (%)	Volume mesuré (m³)	Volume calculé Voglans (m³)	Volume calculé Chambotte (m³)	Erreur relative Voglans (%)	Erreur relative Chambotte (%)	Débit max mesuré (m³)	Débit max calculé Voglans (m³)	Débit max calculé Chambotte (m³)	Erreur relative Voglans (%)	Erreur relative Chambotte (%)
09/08/2007	14	18.8	-25.53%	35115.54	30121.56	34192.08	-14.22%	-2.63%	1.226799	0.8018	1.3203	-34.64%	7.62%
20/08/2007	9.8	7	40.00%	25222.97	28008.36	26385.57	11.04%	4.61%	0.742177	1.2059	0.9457	62.48%	27.42%
21/08/2007	20.4	21.6	-2.42%	33350.25	35796.6	37016.55	7.34%	10.99%	1.21618	1.3505	1.1664	11.04%	-4.09%
29/08/2007	24.2	24.8	-2.42%	35569.6	39528.36	36236.88	11.13%	1.88%	1.461968	1.5117	1.7652	3.40%	20.74%
Erreur relative moyenne			2.41%				3.82%	3.71%				10.57%	12.92%

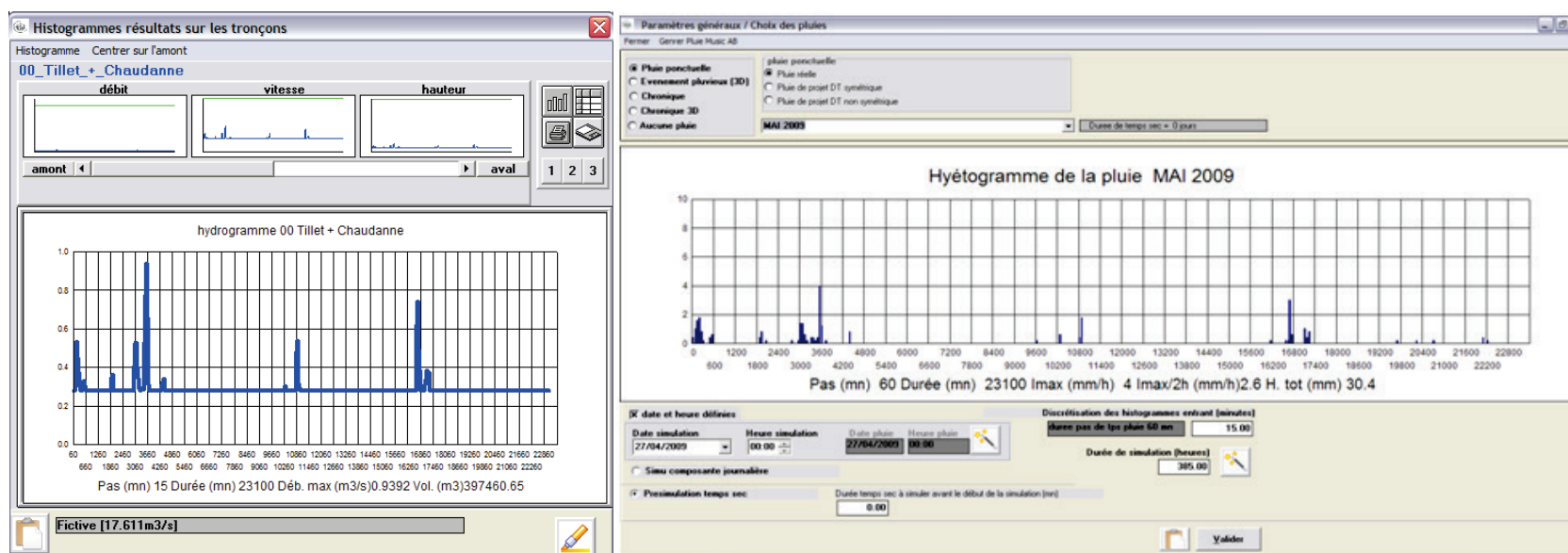


Figure 203 : Hyétogramme de la campagne de prélèvement du mois de mai 2009 (à gauche) et hydrogramme correspondant obtenu après modélisation (à droite).

A la vue de ces résultats, nous avons quand même décidé d'utiliser ce modèle avec les données de pluies enregistrées à Voglans. Mais il est nécessaire de garder à l'esprit les différences dans les résultats obtenus. Ces différences sont principalement dues au caractère très localisé des événements orageux mais aussi au pas de temps des outils utilisés (pluviomètres et limnigraphes). Il serait intéressant, en vue d'une utilisation régulière de ce modèle, d'installer un nouveau pluviomètre sur la commune d'Aix-les-Bains, plutôt dans la partie amont du réseau. Dans ce cas, le modèle pourra être retravaillé afin d'améliorer ses résultats.

Un exemple de simulation est présenté dans la Figure 203.

9.2 Couplage entre le modèle pluie-débit et les données sur le transport de charge

Une fois le modèle pluie-débit fonctionnel, il a été nécessaire de définir la valeur de débit à partir de laquelle des fragments de biofilms contenant *Lpn* sont arrachés dans le réseau aixois puis transportés en direction de la plage.

La recherche de ce seuil a été effectuée à la fois à partir de données concernant la colonne d'eau et de données concernant les biofilms. Les premières ont été acquises spécifiquement pour ce modèle (chapitre 9.2.1) tandis que les secondes (chapitre 9.2.2) proviennent de l'étude des biofilms prélevés à la station Aquarium dans le cadre des deux premiers volets de l'étude, c'est-à-dire lors de l'inventaire de *Lpn* dans les principaux affluents du lac ou lors de l'étude de l'influence des rejets d'eaux thermales sur le réseau hydrographique aixois (chapitres 5 et 6).

9.2.1 Détermination du débit critique par l'étude de la charge de la colonne d'eau

Des mesures de transports de charges ont été effectuées, à l'aide d'un filet à dérive, dans la partie aval du réseau aixois, à une centaine de mètres en amont de la station aquarium. 21 mesures ont été effectuées sur 13 journées comprises entre le 12 mai 2009 et le 17 juillet 2009. Le caractère plutôt organique ou minéral de chaque échantillon a été déterminé, mais, en raison de l'importance des matériaux grossiers dans les échantillons, il n'a pas été possible d'effectuer des analyses bactériologiques plus précises.

Une première série de mesures, du 12 au 27 mai 2009, a été effectuée en conditions d'étiage, afin d'optimiser le temps de pose du filet.

Au cours de deux journées, les 25 et 27 mai 2009, trois mesures ont été effectuées successivement avec un temps de pose de respectivement, 30 min, 1 h et 1 h 40 (Figure 204).

Dans les deux cas, on remarque une baisse de la charge du cours d'eau avec l'augmentation de la durée du prélèvement. Plusieurs raisons peuvent être à l'origine de ce phénomène. La plus probable reste le colmatage du filet qui refoule alors une partie des particules. Mais, puisque ce phénomène est présent lors des deux expériences alors que les débits sont différents, une seconde hypothèse est possible. Il peut s'agir de l'existence d'une variation cyclique de la charge transportée par le cours d'eau au cours de la journée, se reproduisant quelles que soient les conditions hydrologiques (Quay, 2009).

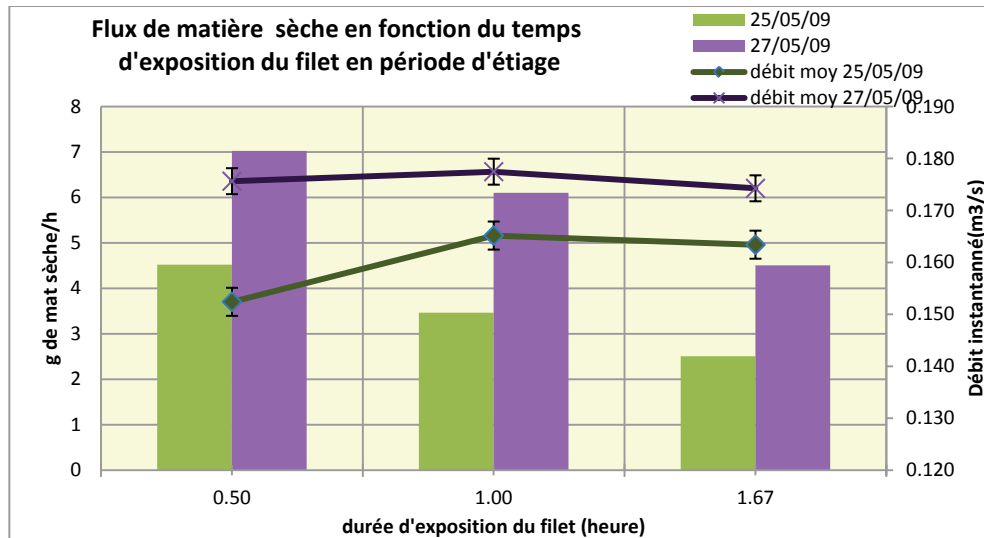


Figure 204 : Effet de la durée d'exposition du filet sur la mesure de la matière sèche (A. QUAY).

Les échantillonnages suivants, effectués entre le 27 mai et le 17 juillet 2009, sont tous consécutifs à un épisode orageux. Le temps de pose du filet a été limité à 20 minutes. Les mesures de poids sec et de matière organique ont ensuite été effectuées sur les échantillons obtenus.

Pour l'ensemble de ces événements, le débit du cours d'eau a été modélisé à partir des précipitations enregistrées à Voglans, pour une période allant de 12 heures avant la pose du filet jusqu'à 4 heures après son retrait. Nous avons ensuite considéré le débit maximal obtenu pendant la pose du filet et recherché un impact du débit maximal sur l'importance de la fraction organique de la charge du cours d'eau (Figure 205).

Notre choix s'est porté sur le débit maximal plutôt que sur le débit médian ou moyen. Le débit maximal nous semble en effet plus important que ces derniers dans les processus de décrochage du biofilm. Car il est reconnu que l'arrachage du biofilm est un processus bref intervenant dans les minutes qui suivent une augmentation de débit (Horn, *et al.*, 2003).

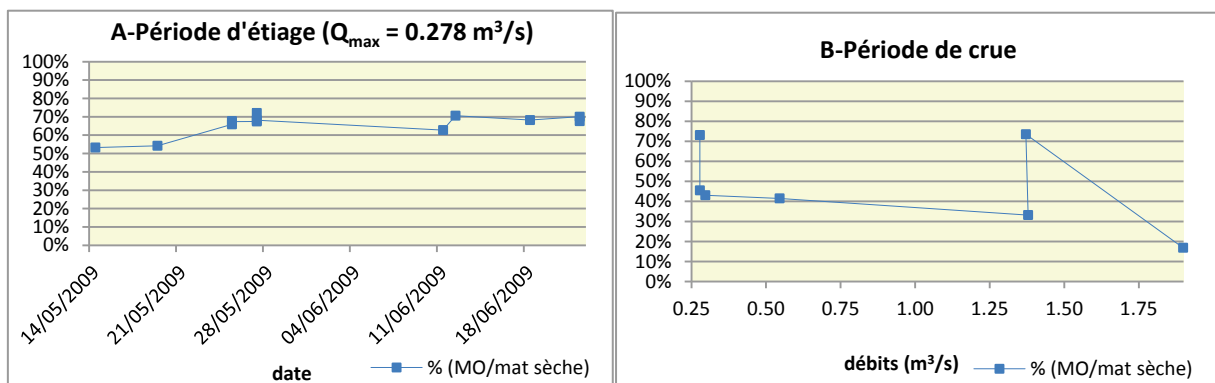


Figure 205 : Evolution de l'importance de la fraction organique transportée en période d'étiage (A) et en fonction du débit maximal en période de crue (B).

En période d'étiage (Figure 205 A), le modèle ne permet pas d'observer de différences entre les valeurs de débit maximal, il est toujours de $0.278 \text{ m}^3/\text{s}$. En raison de la valeur constante du débit maximal, l'évolution de la proportion de matière organique de la charge du cours d'eau a dû être représentée en fonction de la date d'échantillonnage. On remarque alors, qu'à l'étiage, les matières en suspension sont majoritairement organiques.

Suite à un épisode orageux (Figure 205 B), si les précipitations sont suffisantes pour modifier le débit modélisé, on remarque, à deux exceptions près, que la charge du cours d'eau n'est plus majoritairement organique mais qu'elle devient majoritairement minérale. Ceci s'explique par la remise en suspension suivie du transport de sédiments en amont du filet. Ces particules minérales peuvent avoir un effet abrasif important sur les biofilms et faciliter ainsi le détachement de fragments plus ou moins gros, augmentant ainsi le risque de retrouver *Lpn* dans ces fragments et donc dans la colonne d'eau.

A deux occasions le débit est de $0.278 \text{ m}^3/\text{s}$, car les événements pluvieux ne sont pas assez importants pour modifier le débit, par contre dans l'un de ces deux cas, la proportion de matière organique n'est que de 45%. Il est alors possible que la valeur du débit ne soit pas correcte en raison d'un biais dû à l'emplacement du pluviomètre. En effet, on constate l'existence d'un épisode orageux se terminant 2 h avant la pose du filet, et dont le débit maximal est de $1.071 \text{ m}^3/\text{s}$.

Une deuxième valeur fait exception, elle concerne le débit de $1.371 \text{ m}^3/\text{s}$, pour lequel la proportion de matière organique est de 74%. Dans cas-là, il est possible qu'il y ait eu une accumulation de feuilles ou d'un autre type de fragments organiques provenant de la rive et faussant ainsi la détermination de charge organique de la colonne d'eau. Il est également possible que l'épisode orageux ait été plus intense à Voglans qu'à Aix-les-Bains n'occasionnant pas une augmentation de débit aussi intense que celle modélisée.

Ces données nous permettent seulement de dire qu'à partir d'une valeur de débit de $0.296 \text{ m}^3/\text{s}$, la charge du cours d'eau devient majoritairement inorganique, probablement en raison de la remise en suspension du sédiment. Cette charge peut alors augmenter l'érosion du biofilm et ainsi favoriser l'apport de *Lpn* vers le jet d'eau de la plage. Cette valeur de $0.296 \text{ m}^3/\text{s}$ peut donc représenter le débit critique à partir duquel la présence de *Lpn* dans la colonne d'eau peut s'intensifier.

9.2.2 Détermination du débit critique par l'étude des biofilms à la station Aquarium

Dans le but de confirmer le débit seuil proposé à partir de l'étude de la proportion de matière organique dans la colonne d'eau, nous avons recherché l'impact du débit sur les concentrations des bactéries_{totales} et de *Lpn*_{totales} dans les biofilms de la station Aquarium au cours de l'ensemble des campagnes effectuées en période estivale. Ces données proviennent donc à la fois de l'inventaire de *Lpn* dans les affluents du lac du Bourget (chapitre 5) et de l'étude plus particulière consacrée au réseau aixois (chapitre 6). Un total de 7 campagnes sont concernées (Tableau 130).

Tableau 130 : Campagnes des volets I et II utilisées pour la détermination du débit seuil.

Volet « Bassin Versant »	Volet « Réseau Aixois »
Août 2007	Juin 2008
Mai 2008	Septembre 2008
Juillet 2008	Juin 2009
Mai 2009	

Le débit utilisé ici n'est pas le débit mesuré directement à la station Aquarium, mais celui modélisé à partir des précipitations enregistrées à Voglans pour les 15 jours d'incubation des substrats artificiels de chaque campagne. Le débit moyen journalier a ensuite été calculé à partir des données modélisées avec un pas de temps de 15 minutes. Puis, dans le but de simplifier la matrice de données et dans un souci d'homogénéité avec le reste de l'étude, nous avons calculé puis utilisé la valeur médiane des débits moyens journaliers de chaque campagne pour la confronter aux données biologiques obtenues précédemment pour chacune de ces campagnes (concentrations bactériennes, en *Lpn*, poids sec, matière organique).

La représentation des concentrations en bactéries_{totales}, des *Lpn*_{totales} en fonction du débit médian montrent des résultats intéressants pour la détermination du seuil de débit (Figure 206).

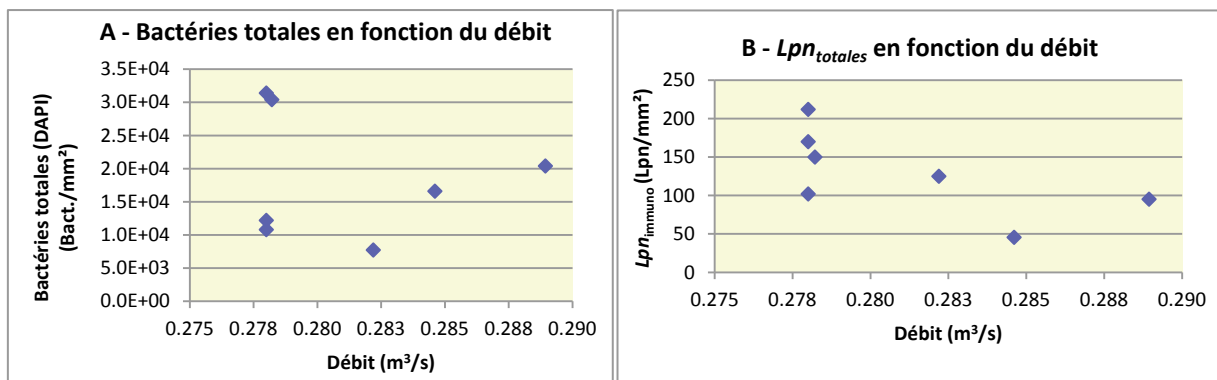


Figure 206: Concentration en Bactéries_{totales} (A) et en *Lpn*_{totales} (B) dans les biofilms en fonction du débit médian modélisé sur la période d'incubation

La concentration des bactéries_{totales} est assez variable lorsque le débit médian correspond au débit d'étiage (soit 0.278 m³/s). Elle diminue ensuite pour un débit médian de 0.282 m³/s, avant d'augmenter pour les débits supérieurs.

Jusqu'à un débit médian de 0.282 m³/s, l'augmentation du débit a uniquement un effet abrasif sur le biofilm, expliquant la baisse de la concentration des bactéries_{totales}. Pour les débits supérieurs, cet effet abrasif est compensé par un phénomène de re-sédimentation des bactéries présentes dans la colonne d'eau en concentration suffisante. Ce phénomène de re-sédimentation est permis grâce aux changements hydrodynamiques engendrés par les tubes dans lesquels sont placés les substrats artificiels. L'intérieur de ces tubes représente en effet une zone plus calme que la colonne d'eau, où les fragments de biofilms ainsi que les bactéries qui se sont décrochés plus en amont dans le réseau peuvent sédimenter sur les substrats artificiels.

Les concentrations de *Lpn*_{totales} suivent la même évolution que les concentrations des bactéries_{totales} (Figure 206). La concentration observée dans le cas du débit d'étiage est, en effet, très variable puis l'augmentation du débit se traduit par une baisse de la concentration de *Lpn*_{totales}. La concentration minimale ne correspond plus à un débit médian de 0.282 m³/s mais à un débit médian de 0.284 m³/s. Il est ensuite possible que la concentration de *Lpn*_{totales} augmente à nouveau pour les débits supérieurs, mais nous ne possédons pas assez de données pour l'affirmer (Figure 206). Si cette tendance se confirme, le débit permettant le phénomène de re-sédimentation de *Lpn* sur les substrats artificiels a donc pour valeur : 0.284 m³/s.

Dans cette partie, nous avons choisi d'utiliser comme valeur seuil, le débit à partir duquel il nous est possible d'observer la re-sédimentation des bactéries_{totales}, et plus particulièrement de *Lpn*_{totales}, sur les biofilms des substrats artificiels. L'existence d'une telle re-sédimentation signifie en effet, que la charge bactérienne, ainsi que celle de *Lpn*, dans la colonne d'eau est importante. Ces bactéries et *Lpn* proviennent de l'érosion de biofilms situés en amont de la station Aquarium et sont transportées en direction de la station Aquarium puis de la plage. Le passage de l'eau dans les tubes supports des substrats artificiels facilite ensuite le phénomène de re-sédimentation.

Le débit seuil est ainsi estimé à une valeur de 0.282 m³/s lorsque l'on considère les bactéries_{totales} et à 0.284 m³/s pour *Lpn*_{totales}. La différence est donc très faible entre ces deux cas. Etant donné que le modèle doit servir à prédire les arrivées de *Lpn* (et non pas de l'ensemble des bactéries) au niveau de la plage, nous avons donc défini comme seuil de débit la valeur de 0.284 m³/s.

Le stress engendré par les forces de cisaillement sur les bactéries_{cultivables} et sur *Lpn*_{cultivables} remises en suspension dans la colonne d'eau suite à l'érosion des biofilms peut alors rendre ces formes non cultivables, expliquant ainsi l'absence de résultat lorsque l'on considère l'évolution des concentrations des formes cultivables en fonction du débit médian.

9.2.3 Conclusion

Les deux approches présentées précédemment font intervenir deux compartiments différents du cours d'eau, mais conduisent à la détermination de seuils très proches : 0.296 m³/s dans le cas des mesures de transport de charge et 0.284 m³/s dans le cas de l'étude des biofilms. Du fait de la proximité de ces 2 valeurs, nous avons choisi d'établir le seuil de débit critique vis-à-vis du transport de *Lpn* en direction de la plage d'Aix-les-Bains, comme la moyenne de ces 2 valeurs, soit un débit de 0.290 m³/s. Si de nouvelles données sont acquises sur le réseau à l'occasion d'une nouvelle étude, cette valeur pourra être réajustée si nécessaire.

Parce qu'il est de type environnemental, ce modèle doit être évolutif en raison notamment des changements de l'occupation humaine dans le bassin versant mais aussi de phénomènes de plus grande ampleur, tels que les changements climatiques. L'amélioration du modèle, peut porter sur la partie modélisation proprement dite et/ou sur la détermination du débit critique évoqué plus haut.

Deux améliorations principales pourraient être apportées à la partie modélisation :

- son calage, qui nécessiterait une meilleure connaissance du régime des pluies grâce à l'installation d'un pluviomètre sur les hauteurs d'Aix-les-Bains.
- l'ajout de termes relatifs à l'hydrodynamique du transfert de l'eau et des charges depuis le débouché de la Chaudanne dans le lac jusqu'au point de pompage en face de la plage municipale.

D'autres expériences permettraient de confirmer la valeur du seuil de débit nécessaire au décrochage et au transfert de *Lpn* vers la plage. Il pourrait s'agir d'une analyse plus détaillée de la charge du cours d'eau pour différents régimes de crue (en bactéries et en *Lpn*, en particulier). L'étude pourrait porter également sur l'origine de ces charges et notamment les biofilms en place caractérisés par leur épaisseur mais aussi l'abondance et la composition des communautés microbiennes. Des mesures sur l'eau au niveau du point de pompage du jet d'eau pendant et à la suite d'événements orageux pourraient compléter ces données. De nombreuses difficultés subsistent à la fois pour la mise en place de telles expériences (acquisition d'échantillons en correspondance avec les événements pluvieux) et en termes analytiques (discrimination de la composante microbienne dans la charge totale transportée par le cours d'eau).

Un guide détaillé pour l'utilisation du modèle sera fourni à la commune d'Aix-les-Bains, en vue d'une utilisation future. L'utilisation de ce modèle est rapide et s'effectue en 4 grandes étapes à partir d'un tableur de type Microsoft Excel™ :

- entrée (manuelle ou automatique) des données pluviométriques dans une feuille de calcul pour la « préparation » des données (changement de format).
- l'événement pluvieux est alors créée dans la banque de pluies du logiciel CANOE (Figure 203).
- lancement des calculs (modélisation du débit en correspondance avec l'événement pluie).
- représentation graphique du débit (Figure 203) et visualisation de l'existence ou non d'un risque associé au transport de *Lpn* dans la Chaudanne.

Un premier outil est donc disponible et immédiatement opérationnel sur ce réseau. Il permettra de conseiller l'équipe technique sur la mise en route du jet d'eau au niveau de la plage d'Aix-les-Bains afin de limiter le risque d'aérosolisation de *Lpn* provenant de la Chaudanne.

10 Conclusions et perspectives

Au terme de ce manuscrit, il nous apparaît utile de rappeler que le projet est la première étude menée sur les biofilms des affluents du lac du Bourget et la première également traitant de la distribution de *Legionella pneumophila* au sein de ces communautés fixées.

Il s'agissait donc d'un travail exploratoire pour lequel notre choix a été de nous placer d'emblée à trois échelles d'analyse : celle du système entier (les affluents du lac du Bourget), et celles de 2 niveaux de détail, celui de l'un des réseaux hydrographiques concernés (le réseau du bassin aixois) et celui de microcosmes (partie expérimentale) dans un cadre original qui se situait à mi-chemin entre le milieu naturel et le laboratoire.

Pour des questions de faisabilité, ce choix impliquait de limiter le nombre des descripteurs compte tenu du nombre d'observations qui devaient être réalisées. Sachant par ailleurs que le travail s'adressait directement à des contextes environnementaux, hautement multifactoriels, donc, il était attendu qu'une partie des interprétations reste à l'état d'hypothèses. Par ailleurs, peu d'études se sont intéressées au développement et aux facteurs de régulation des biofilms dans un contexte environnemental et encore moins au cas de *Lpn* au sein de ces biofilms (Costerton, 2007, Declerck, 2009, Taylor, 2009). Les possibilités de comparaison de nos résultats avec ceux d'autres auteurs restaient donc très limitées.

Des conclusions spécifiques ont été données à la fin de chacun des 6 chapitres du mémoire. Nous en reprenons ici, les principaux éléments à partir desquels nous tenterons de donner une image intégrée de la situation du sujet : la présence de *Lpn* dans les biofilms des milieux naturels et ses facteurs de régulation, en évoquant, bien entendu, les prolongements qui devraient être donnés à ce travail.

La première partie de l'étude a permis de valider l'utilisation des substrats artificiels pour étudier les biofilms dans les cours d'eau. Après 15 jours de développement dans les cours d'eau, les biofilms sont considérés comme encore relativement jeunes. On note en effet, des différences marquées avec les biofilms échantillonnés sur des substrats naturels. Les différences concernent principalement les concentrations des micro-organismes. A l'inverse, lorsque l'on s'intéresse aux proportions des différents groupes d'organismes, les biofilms développés sur substrats artificiels sont bien représentatifs de ceux des substrats naturels. C'est notamment le cas de la proportion de *Lpn*_{totales}.

Le Tableau 131 récapitule les concentrations observées sur chaque type de substrats et rappelle les valeurs trouvées dans la bibliographie. Il confirme le caractère plutôt jeune des biofilms obtenus sur les substrats artificiels pour lesquels la concentration des bactéries_{totales} reste généralement inférieure d'un facteur 10 à 100 à celle des biofilms matures. Pour la concentration des protistes les différences sont bien moins nettes, notamment du fait de la grande variabilité des valeurs.

Ces résultats pourraient nous inciter à reconsidérer la durée d'incubation à laquelle nous nous étions arrêtés afin d'obtenir des biofilms plus proches de la maturité. C'est ce qu'évoquent plusieurs auteurs: Jackson, *et al.* (2001), Kathol, *et al.* (2009), ou Pohlen, *et al.* (2010), pour qui plusieurs mois sont nécessaires pour atteindre ce stade de développement. Dans la pratique, nous considérons que la période de 15 j constitue un bon compromis pour le type de milieu sur lesquels ont porté nos analyses et pour le type de questions auxquelles nous cherchions à répondre. Il faut notamment garder à l'esprit le fait que toute augmentation de la durée d'incubation accroît le risque de perturbations liées à la survenue d'événements hydrauliques ou météorologiques ponctuels.

Pour les protistes (Hunt & Parry, 1998, Norf, *et al.*, 2007) considèrent que 14 jours suffisent à la stabilisation des concentrations. Nos résultats vont dans le même sens.

Tableau 131 : Tableau récapitulatif des gammes de concentrations des bactéries_{totales} et des protistes totaux en fonction du type de substrat et concentrations obtenues sur des biofilms matures dans la bibliographie.

	Concentrations sur S.Naturels	Concentrations sur S.Artificiels (volets Bassin Versant et Aix-les-Bains confondus)	Données biblio dans des biofilms matures
Bactéries totales	3×10^6 à 6.5×10^7 bact./cm ²	1.5×10^5 à 4×10^6 bact./cm ²	5×10^6 à 15×10^7 bact/cm ² (Lazar, Hunt & Parry, 1998, Stoodley, <i>et al.</i> , 2001, Pohlen, <i>et al.</i> , 2010)
Protistes	1.65×10^4 à 7.32×10^5 cellule/cm ²	2.6×10^2 à 1.3×10^9 cellule/mm ²	10^2 et plus de 10^6 cellule/cm ² (Franco, <i>et al.</i> , 1998, Hunt & Parry, 1998, Kathol, <i>et al.</i> , 2009, Wey, <i>et al.</i> , 2009)

Les substrats artificiels révèlent la présence de la forme cultivable de *Lpn* dans un plus grand nombre de stations que les substrats naturels. Nos analyses ont montré que c'était également le cas, ponctuellement, pour les proportions de bactéries cultivables au sens large. Ces résultats laissent supposer que les conditions environnementales à l'intérieur des biofilms matures sont moins favorables aux formes cultivables des bactéries, au sens large, que les conditions rencontrées dans les biofilms plus jeunes.

Une autre différence notable entre les deux types de support, concerne la présence de ciliés et de flagellés autotrophes uniquement sur les substrats artificiels. Cette observation rejoint le fait que la communauté de protistes présente une plus grande diversité sur substrats artificiels que sur substrats naturels (Hunt & Parry, 1998). Elle va également dans le sens d'une modification de la communauté de protistes au cours du développement du biofilm à l'exemple des modifications des flagellés hétérotrophes suite au changement de leurs proies bactériennes (Wey, *et al.*, 2008).

L'utilisation de substrats artificiels procure deux avantages principaux : leur surface de développement est bien définie car non rugueuse, et l'âge du biofilm est connu. Cela permet, entre autres, la comparaison du développement de biofilms entre différents sites et/ou différentes saisons, comme nous l'avons fait ici. La durée de développement du biofilm peut alors être définie en fonction des objectifs et des contraintes de l'étude. Il va de soi qu'en standardisant les supports, la mesure effectuée est plus celle de la pression de colonisation des surface vierges et de la capacité du système de soutenir le développement d'un biofilm, abstraction faite des effets spécifiques des "supports en place" qu'il offre à la colonisation.

L'utilisation des substrats artificiels présente donc l'avantage de diminuer la variabilité inter-réplicats de plusieurs descripteurs, car les biofilms des substrats naturels de cours d'eau sont reconnus comme fortement hétérogènes. Il a été montré à ce sujet que la variabilité sur un même substrat tout comme la variabilité temporelle (à l'échelle de la semaine) pouvaient être supérieures à la variabilité spatiale au sein d'une section d'un cours d'eau (à l'échelle de mètres) (Lear, *et al.*, 2008).

Après deux années d'échantillonnages, nous pouvons affirmer que les dispositifs utilisés sont fiables. Nous avons ainsi dénombré seulement 8 pertes pour 111 groupes d'échantillons. L'origine des pertes étant généralement de 2 types : l'érosion du fil reliant les tubes supports de lames ou de la cordelette utilisée pour fixer les échantillons à la rive du cours d'eau et les actes de vandalisme. Nous avons pu agir sur l'érosion en modifiant les matériaux servant à relier les tubes entre eux et en protégeant la cordelette à l'aide d'un tube en plastique.

Pour rester sur le plan technique, nous souhaitons, estimer dans cette étude, les formes VBNC de *Lpn*. Dans ce but nous avons tenté de coupler de nombreuses techniques de marquage de l'activité bactérienne (activité enzymatique, activité métabolique au sens large, croissance) ou de l'intégrité membranaire avec les techniques d'identification spécifiques de *Lpn* (Immunofluorescence et FISH). Le couplage de ces différents marquages est généralement assez difficile, en raison de la superposition des spectres d'absorption/d'émission des différents fluorochromes. En outre le résultat dépend fortement des caractéristiques de l'équipement en microscopie (Joux & Lebaron, 2000). Les résultats obtenus n'étant pas concluants, nous avons conservé la méthode FISH comme marqueur de *Lpn* potentiellement « actives ».

Nous avons fait le constat à la fin de la période d'acquisition des données que le rapport $Lpn_{FISH}/Lpn_{totales}$ était souvent très supérieur à la valeur de 100%.

Les très fortes valeurs du rapport peuvent trouver plusieurs explications :

- Un marquage des $Lpn_{totales}$ par le kit immunofluorescence qui ne reconnaîtrait pas tous les sérogroupes
- Un problème de spécificité de la sonde Legpne1 utilisée dans la technique FISH.

Nous pensons qu'il s'agit plus vraisemblablement d'un problème de spécificité de la sonde FISH. Cette sonde a tout d'abord été décrite comme ne marquant que les sérogroupes 1,3,4 et 6 (Grimm *et al.*, 1998). Une étude plus récente a montré qu'elle s'hybridait également avec d'autres sérogroupes de *Lpn* (2, 8, 9, 10, 11 et 13), mais aussi que des hybridations avec d'autres espèces du genre *Legionella* semblaient fréquentes (Willks and Keevil, 2006).

Une alternative serait l'utilisation d'une sonde PNA (Peptid Nucleic Acid), dont la séquence reprend les 15 dernières bases de la sonde Legpne1. Cette sonde, appelée PLPNE620, s'hybriderait à tous les sérogroupes de *Lpn* et à seulement deux autres espèces de légionelles non pneumophila. De plus, l'utilisation de ces sondes PNA nécessitent des conditions d'hybridation moins rigoureuses (Willks and Keevil, 2006). C'est en raison du coût de la sonde PLPNE620 et des résultats obtenus au cours des premières campagnes, que nous avons choisi de conserver la méthode FISH avec la sonde Legpne1.

De leur côté, les valeurs légèrement supérieures à 100% peuvent s'expliquer par les erreurs de comptages des échantillons à cause de leur hétérogénéité, d'une part et, d'autre part, de leur charge en particules qui gêne l'identification des cellules.

Ces erreurs pourraient également être diminuées en utilisant une sonde PNA, ou en effectuant un traitement au chloramphénicol qui est un inhibiteur de la synthèse des protéines et de la dégradation des ARNr. L'accumulation des ARNr qui en résulte permet, en principe, d'obtenir un marquage plus intense. Une autre solution pourrait être une amplification enzymatique du signal (TSH-FISH et CARD-FISH), mais ces méthodes nécessitent un prétraitement important des cellules et doivent être validées dans le cadre de biofilms naturels (Zwirgmaier, 2005).

L'application de la technique de PCR quantitative aux échantillons du volet Bassin Versant a fait apparaître des problèmes d'inhibition dans un grand nombre de cas (15% des échantillons). Par ailleurs, le seuil de quantification s'est avéré trop élevé pour nos échantillons (165 UG/L ; (Yaradou, *et al.*, 2007). Nous avons donc considéré que les résultats n'étaient pas exploitables, et avons rejoint en cela les conclusions de Brooks *et al.* (2004) qui trouve des inhibiteurs de PCR dans 20% des échantillons d'eau souterraines et de biofilms. Le problème d'inhibition de l'amplification est un problème récurrent dans l'environnement et peut provenir de composés humiques, de rouille, d'une forte concentration de cations divalents ou de sels au sens large. Des techniques basées sur l'utilisation de colonnes de purification de l'ADN ou la levée de l'inhibition à l'aide de sérum albumine bovine existent (Toze, 1999, Riffard, *et al.*, 2001, Levi, *et al.*, 2003) et pourraient améliorer les résultats. Ces essais semblent devoir demander encore un gros travail de mise au point. Par ailleurs, cette technique ne nous donnerait pas plus d'indication sur la concentration des formes VBNC, car elle s'adresse aux formes "totales" des bactéries (à la fois les formes vivantes, dont les VBNC, et les formes mortes ayant conservé leur ADN) (Levi, *et al.*, 2003, Yanez, *et al.*, 2005, Behets, *et al.*, 2007, Dusserre, *et al.*, 2008).

Une recherche de phages spécifiques à *Lpn* a été effectuée par le Centre National de Référence des Légionelles (CNRL, Lyon), selon le protocole de Lammertyn *et al.* (2008), sur des échantillons (biofilms et eau) provenant des stations aixoises ainsi que des biofilms prélevés sur les substrats naturels du bassin de rejet des Thermes Chevalley. Après plusieurs campagnes sans résultat positif, les tests ont été arrêtés. Le problème reste donc entier à ce jour, d'un protocole qui nécessiterait encore une mise au point ou de l'inexistence effective de phages à *Lpn*, tout au moins dans nos échantillons.

Il est à noter encore sur le plan technique, qu'une partie des résultats a été acquise à partir d'incubateurs expérimentaux qui présentaient l'originalité d'être alimentés directement à partir de l'eau de l'un des cours d'eau étudiés dans une galerie souterraine. Les conditions d'incubation des biofilms se situaient donc à mi-chemin entre les conditions naturelles et celles d'un laboratoire.

Ce travail exploratoire apporte tout d'abord des valeurs d'ordre de grandeur de concentrations et de variabilités pour les organismes à travers lesquels les biofilms ont été décrits. Rappelons à ce sujet la grande diversité des sites explorés : strate superficielle du lac, où la composante algale des biofilms était évidemment importante, cours d'eau de surface, eux aussi exposés à la lumière solaire et cours d'eau souterrains plus ou moins rapides.

Les gammes de concentrations des bactéries et des protistes ont été évoquées précédemment (Tableau 131). Les bactéries_{cultivables} représentent en général de 10 à 20% des bactéries_{totales} dans les biofilms du réseau aixois et moins de 15% dans ceux du bassin versant. Des valeurs extrêmes sont occasionnellement rencontrées. Ces proportions de formes cultivables sont élevées par rapport à celles habituellement rencontrées dans la colonne d'eau. Ce constat est sans doute à rapprocher du fait que l'activité respiratoire des bactéries des biofilms est généralement supérieure à celle des bactéries de la colonne d'eau, comme l'ont observé Araya *et al.* (2003), par exemple. Par ailleurs, nos résultats montrent que les arrivées d'eaux chaudes au sein du réseau aixois semblent avoir tendance à favoriser la forme cultivable.

L'ensemble de nos données (Bassin versant et Aix-les-Bains) confirment le caractère ubiquiste de *Lpn* dans les milieux aquatiques au sens large (Atlas, 1999, Declerck, 2009), et ceux obtenus par d'autres auteurs dans des milieux souterrains (Riffard, *et al.*, 2001, Brooks, *et al.*, 2004). *Lpn* représente en général moins de 2% des bactéries_{totales} quel que soit le volet de l'étude, mais elle peut occasionnellement représenter jusqu'à 5% de la communauté bactérienne d'un biofilm. Il est à noter que ces proportions relativement fortes, sont celles d'une bactérie potentiellement pathogène.

La forme cultivable de *Lpn* est moins fréquente : elle représente moins de 1.5% de *Lpn*_{totales} et moins de 0.3% des bactéries_{cultivables}. Sur l'ensemble des volets environnementaux (bassin versant du lac et bassin aixois), la présence de formes cultivables de *Lpn* dans les biofilms des affluents du lac du Bourget reste presque exclusivement localisée à la station Aquarium. En outre il nous paraît important de signaler que lorsque des formes cultivables de *Lpn* apparaissent, il se trouve quasi systématiquement parmi elles des colonies du séro groupe 1. Dans le cas du réseau aixois, cette observation confirme les résultats de deux études qui faisaient apparaître les sérogroupes 3 et 1 comme les sérogroupes dominants dans les eaux thermales aixoises (Bornstein, *et al.*, 1989, Molmeret, *et al.*, 2001).

Il est à noter aussi que les dénombrements de la forme cultivable de *Lpn* ont souvent été accompagnés du développement d'une flore annexe importante et donc qu'ils ont pu en être sous-estimés (processus d'antibiose, épuisement du milieu de culture par des espèces à croissance plus rapide, ...). De ce point de vue, le traitement combiné (choc thermique associé à un choc acide des échantillons avant l'ensemencement) ainsi que les dilutions effectuées sur la suspension de biofilm, n'ont pas toujours eu les effets limitant escomptés.

Dans la quasi-totalité de nos dénombrements sous microscope et quelle que soit la nature du biofilm, *Lpn* nous est apparu sous la forme de courts bacilles et seulement exceptionnellement, sous sa forme filamenteuse. Il semble donc que dans les sites étudiés, *Lpn* soit principalement présente sous sa forme infectieuse et non sous sa forme répliquative. Cette observation va donc dans le sens d'une dominance des processus de répllication intra-cellulaire vis à vis des processus de répllication extra-cellulaire. Selon Declerck (2009), les deux modes de multiplication peuvent coexister au sein des biofilms naturels, mais la multiplication extra-cellulaire pourrait être limitée à des conditions précises, elle serait donc très peu fréquente ce qui expliquerait le fait qu'elle n'ait encore pu être mise en évidence.

Le second apport de notre travail concerne les facteurs qui déterminent les caractéristiques (biologiques essentiellement) des biofilms étudiés. Nous avons fait l'hypothèse que les facteurs physiques et notamment l'hydrodynamique, étaient les 1^{ères} variables explicatives du développement des biofilms, comme cela a été montré dans plusieurs études (Battin, *et al.*, 2003, Lyautey, *et al.*, 2005, Costerton, 2007).

Cette hypothèse n'est pas confirmée lorsque les stations du bassin versant sont considérées dans leur ensemble. La subdivision de la matrice de données en "groupes de stations", permet, par contre, de mettre en évidence une influence non négligeable de plusieurs facteurs physico-chimiques sur les descripteurs bactériens, malgré des spécificités très locales.

Les modifications physico-chimiques engendrées par les arrivées d'eaux thermales, à l'amont du réseau aixois, restent perceptibles jusque dans la partie la plus aval du réseau. Elles influencent le développement des biofilms et plus particulièrement celui de *Lpn*. Elles n'affectent pas les mesures globales du développement du biofilm telles que le poids sec ou la concentration (et la proportion) de matières organiques.

La confluence avec l'un des deux bras du Tillet représente un second point d'importance sur ce réseau. Les apports nutritifs de ce ruisseau contrôlent, en effet, la proportion de matières organiques des biofilms et apparaissent ainsi plus importants pour le développement de l'ensemble de la communauté bactérienne fixée que l'apport des eaux thermales

L'apport principal de l'étude concerne évidemment la distribution de *Lpn* dans le réseau, qui était le premier motif de l'initiation du travail. Le projet visait aussi à apporter une première analyse des facteurs susceptibles d'expliquer les concentrations observées.

D'une manière générale, sur l'ensemble des stations, les concentrations de Lpn_{totales} varient en fonction de la saison, avec des valeurs minimales en hiver et de plus fortes concentrations en période estivale. Comme dans le cas du développement général du biofilm, les facteurs de régulation de la présence de Lpn présentent un caractère local très marqué. Ce qui nous a conduits à la réorganisation systématique de nos données en groupes constitués d'une ou plusieurs stations.

Les résultats de la partie consacrée à l'étude du réseau aixois font également apparaître un enrichissement effectif des biofilms en Lpn (sous différents états physiologiques) en liaison avec les apports des sources thermales, ceux du rejet de la bache mais aussi ceux issus du Tillet. Il apparaît en outre qu'aucun de ces apports n'est prépondérant vis-à-vis des autres. L'effet de l'enrichissement reste très localisé, avec occasionnellement, dans les stations aval, un retour à une concentration inférieure ou égale à celle de la station de référence (station Mirabeau, située en amont), ce qui pourrait être la manifestation de processus naturels d'autoépuration le long du cours d'eau.

Deux des facteurs de régulation potentiels ont plus particulièrement été étudiés : la vitesse de l'eau et sa température. Les effets du facteur vitesse sont variables et plutôt localisés. La réaction des biofilms aux variations de débits relève de processus complexes multiparamétriques (type de bassin versant, morphologie du lit, type de substrat...). La spécificité de la réaction de chaque cours d'eau (et donc de chaque station) n'est donc pas surprenante.

La simple observation visuelle des biofilms du réseau aixois montre qu'il existe bien une influence de la vitesse de l'eau sur le développement du biofilm. En effet, la station Liège, où les biofilms sont soumis aux forces de cisaillement les plus fortes, apparaissent comme les moins épais. Plusieurs études montrent que d'importantes forces de cisaillement se traduisent effectivement par la formation de biofilms plus minces, plus denses, ainsi que par la baisse de la diversité bactérienne et une maturation plus lente (Kwok, *et al.*, 1998, Rochex, *et al.*, 2008). Nos résultats sur les stations du bassin versant vont également dans ce sens, avec des corrélations négatives entre la concentration des matières organiques du biofilm (ou leurs proportions) et les caractéristiques des débits (débit médian et fréquence d'augmentation).

Les débits ne semblent pas influencer de manière significative l'occurrence de Lpn dans les biofilms de la plupart des groupes de stations définis dans le cadre de l'étude du bassin versant. A l'inverse, dans le réseau aixois, la vitesse de l'eau semble être un facteur intervenant dans le maintien de Lpn (même sous sa forme cultivable) dans les biofilms situés à l'aval des apports d'eaux thermales.

Nos résultats montrent également que les débits peuvent influencer plus particulièrement les relations entre Lpn et ses hôtes potentiels : les amibes. C'est le cas, dans les stations du groupe Laysse, Hyères, Albanne et à la station Aquarium, où l'augmentation du débit favorise les Lpn_{totales} par rapport aux amibes. La même observation a été effectuée sur le réseau aixois au niveau de la station Parking, mais elle concerne alors le débit médian, calculé sur la période des 15 jours qui précèdent l'incubation des lames dans le cours d'eau.

Une première hypothèse a été émise pour le cas des stations du bassin versant : à plus fort débit, les amibes faciliteraient le maintien de Lpn sur le substrat (protection physique), Lpn effectuerait alors un cycle de multiplication intra-cellulaire avant de lyser l'amibe, engendrant à la fois une augmentation de la concentration de Lpn et une baisse de celle des amibes.

Une deuxième hypothèse a été envisagée dans le cas du réseau aixois et plus particulièrement de la station Parking. Le débit durant la période précédant l'incubation pourrait conduire à des conditions physico-chimiques qui favorisant l'enkystement des amibes (présence de certains ions tels que Mg^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , pression partielle en CO_2 élevée, carence nutritive et plus particulièrement, en glucose, présence de résidus galactose selon (Aguilar-Díaz, *et al.*, 2011). Ces kystes pourraient ensuite intégrer passivement les biofilms où ils n'exerceraient évidemment pas de prédation sur les bactéries. La multiplication bactérienne et celle de *Lpn* seraient alors plus importantes que celle des amibes, causant ainsi l'augmentation du rapport bactéries/amibes. Cette hypothèse suppose que *Lpn* serait capable de se multiplier dans les biofilms sans passer par la voie intra-amibienne ou grâce à l'utilisation d'autres organismes.

Une troisième hypothèse pourrait expliquer les variations de ces deux rapports : sachant que le passage de l'eau dans les tubes qui supportent des substrats artificiels facilite la sédimentation, le dépôt qui se produit sur les substrats vierges lorsque la charge particulaire de l'eau est importante pourrait limiter leur colonisation par les amibes (à travers le phénomène de compétition pour l'espace).

Cette analyse des effets de l'hydrodynamique et de son rôle en tant que facteur de régulation des biofilms a été complétée par une étude en microcosme. Deux vitesses ont été appliquées à des biofilms sur substrats artificiels préalablement mis à incuber dans la bêche de l'établissement thermal. L'incubation dans l'eau de la rivière, s'est traduite dans tous les cas par une diminution de la concentration de Lpn_{totales} mais qui s'est révélée moins importante dans le cas de la vitesse testée la plus grande. Les essais ont donc confirmé l'influence positive de la vitesse sur le maintien de Lpn_{totales} dans les biofilms. Ce résultat vient en contradiction avec le principe d'élimination des bras morts pour limiter la multiplication de *Lpn* dans le cas des réseaux d'eaux chaudes sanitaires. La vitesse favorise ici le maintien de Lpn_{totales} mais aussi de leur forme cultivable. Des résultats similaires ont été obtenus (Liu, *et al.*, 2006) sur une installation simulant un réseau et ont été expliqués par un meilleur renouvellement des nutriments et de l'oxygène dans le biofilm pour les vitesses les plus élevées.

Le deuxième facteur de régulation auquel nous nous sommes intéressés est la température qui apparaît comme le facteur le plus fréquemment cité pour expliquer la prolifération de *Lpn*. C'est effectivement ce que montrent nos résultats, notamment pour la concentration de Lpn_{totales} dans chacun des groupes de stations définis dans le bassin versant du lac, mais aussi pour la forme cultivable de *Lpn* au niveau de la station Aquarium.

Dans le cas du réseau aixois, l'influence de la température de l'eau sur les différentes formes de *Lpn* se fait principalement ressentir au niveau des 3 stations aval durant les périodes chaudes (campagnes effectuées en juin ou en septembre). A l'exception d'un point, cette remarque concerne aussi le rapport $Lpn_{\text{cultivables}}/Lpn_{\text{totales}}$, avec un effet plus important de la température de l'eau sur la forme cultivable que sur l'ensemble des *Lpn*.

Cette sensibilité plus marquée de la forme cultivable de *Lpn* vis-à-vis de la température est en accord avec les observations effectuées en réacteurs. Ces dernières montrent que l'augmentation de température nécessaire à l'augmentation de la concentration de Lpn_{totales} ($\Delta T=12^\circ C$) est supérieure à celle conduisant à l'augmentation de la concentration de $Lpn_{\text{cultivables}}$ ($\Delta T=8^\circ C$).

Il est important de constater que parmi les températures testées en microcosme, même les plus basses permettent le maintien de *Lpn* dans les biofilms. Ainsi, lorsque des fragments de biofilms sont apportés par les eaux thermales dans le réseau Aixois, les *Lpn* présentes dans ces fragments ne seront pas éliminées par le seul effet de la différence de température entre l'eau thermale et le cours d'eau récepteur.

Un autre résultat important, obtenu à la fois dans le cadre de nos essais en réacteurs et des observations sur sites naturels, est l'absence d'influence de la température sur l'ensemble de la communauté bactérienne du biofilm et sur les concentrations en protistes (malgré un changement des proportions d'amibes et de flagellés). La réponse d'un biofilm est en effet modulée par les interactions entre ses composants. D'autres études ont montré que la biomasse n'est pas modifiée lors d'une augmentation de température tandis que la diversité bactérienne et la contribution des différents groupes de micro-organismes est changée (Vervaeren, *et al.*, 2006, Diaz Villanueva, *et al.*, 2011).

Notre travail souligne l'importance du facteur saisonnier, à travers les variations de la température, de l'hydrodynamique et des concentrations en nutriments. Un changement saisonnier de l'effet de la vitesse de l'eau a notamment été mis en évidence dans le cadre de nos essais en réacteurs, car il est associé à la composition initiale des biofilms.

Le facteur « saison » intervient sur l'équilibre entre le stress lié aux forces de cisaillement et le bénéfice apporté par le renouvellement des nutriments lorsque la vitesse augmente.

Ce facteur apparaît aussi fréquemment dans l'interprétation de nos données sur les sites naturels. Nous faisons le constat que les conditions favorables à *Lpn*, le long du réseau aixois, mais aussi dans les affluents du lac du Bourget, varient à la fois dans l'espace et dans le temps. Leur analyse a donc nécessité la partition de la matrice avec la définition, pour le réseau aixois, d'une saison chaude (campagnes de juin et septembre) et d'une saison froide (campagnes de décembre et mars). Dans les 3 stations les plus aval de ce réseau, les descripteurs physico-chimiques apparaissent avoir un rôle moins important sur la structure biologique des biofilms en période froide, sauf dans le cas particulier des bactéries du groupe "*Pseudomonas* et espèces apparentées" quel que soit leur état physiologique. En période chaude, à l'inverse, le développement des biofilms dans ces 3 stations dépend de paramètres physico-chimiques particuliers dont l'action ne se limite plus à ce groupe de bactéries, mais également à *Lpn*, et à l'ensemble des communautés bactériennes et eucaryotiques. Ainsi, en période chaude, l'apparition d'une relation négative entre la concentration de *Lpn* et celle des amibes, nous a conduits à formuler deux hypothèses :

- Les conditions estivales permettraient aux amibes d'être plus actives, ou d'être moins fréquemment enkystées. Elles exerceraient alors une plus forte pression de prédation qui aurait pour effet de diminuer la concentration des bactéries totales et de *Lpn*.
- le taux d'éclatement des amibes par suite de développements intra-cellulaires de *Lpn*, serait inférieur à leur taux de multiplication, expliquant l'évolution parallèle entre amibes et *Lpn*.

Les concentrations de nombreuses espèces ioniques, à l'intérieur de chacun des groupes de stations, ont également été considérées en tant que facteurs de régulation potentiels. L'analyse de l'ensemble des données des sites naturels a parfois fait apparaître un effet opposé de la même espèce ionique entre deux groupes. Plusieurs hypothèses peuvent être formulées à ce sujet :

- les concentrations ioniques « contrôleraient » effectivement les concentrations et les proportions de *Lpn* dans certains cas.
- un autre facteur externe pourrait agir simultanément sur les concentrations de *Lpn* et sur les concentrations ioniques. Les descripteurs que nous avons choisi de suivre ne nous permettent pas d'identifier ce facteur si tel est le cas.

Des pompes à efflux spécifiques aux métaux, pourraient être impliquées dans ces relations. Ces pompes peuvent en effet jouer un rôle à certains stades du cycle de développement de *Lpn* (Kim, *et al.*, 2009). Il est alors concevable que dans deux contextes chimiques différents une même espèce ionique puisse ainsi avoir un effet opposé.

Nos résultats suggèrent donc, à défaut d'en faire la démonstration définitive, la participation de plusieurs facteurs physiques et chimiques à la régulation de la présence de *Lpn* dans les biofilms environnementaux. Si l'existence de tels facteurs était confirmée, elle viendrait en contradiction avec certains résultats antérieurs (Brooks, *et al.*, 2004) pour lesquels la présence de légionelles dans les eaux souterraines, par exemple, ne présente pas de corrélation avec des paramètres tels que la température, le pH, la conductivité, la turbidité ou la concentration en oxygène dissous, ni même avec les descripteurs biologiques considérés par les auteurs.

L'un des objectifs de l'étude spécifique au réseau aixois était de rechercher l'existence de l'antagonisme *Lpn* - *P. aeruginosa* qui a souvent été mis en évidence dans des conditions expérimentales. Les techniques de dénombrements utilisées n'ont cependant pas été assez sélectives et c'est pourquoi nous avons parlé de ces bactéries sous l'expression "*P. aeruginosa* et bactéries apparentées". Nos résultats montrent l'existence effective d'un antagonisme entre les bactéries de ce groupe et *Lpn*, mais seulement dans les contextes particuliers de certaines campagnes ou de certaines stations, antagonisme qui ne concerne que les « effectifs totaux » des deux groupes. Dans le cas des formes cultivables, au contraire, une relation positive apparaît, elle aussi limitée à certains contextes d'espace ou de temps. Le cas particulier de la station Liège est à souligner par le fait que selon la période considérée, les deux types de relation peuvent y être observés.

L'incertitude sur la nature des bactéries dénombrées et le fait que nous n'ayons pas poussé plus avant nos investigations à ce sujet, ne permettent pas de donner une interprétation à cet antagonisme apparent. Les résultats obtenus peuvent d'ailleurs relever tout autant de processus d'antibiose que d'une simple réponse opposée des deux groupes de bactéries aux mêmes conditions environnementales. Cette dernière possibilité est plus particulièrement suggérée par les résultats que nous avons obtenus en période chaude sur le groupe composé des 3 stations aval.

L'étude comportait enfin un volet qui se voulait opérationnel vis-à-vis du risque de santé publique représenté par la présence de *Lpn* dans le réseau hydrographique et dans le lac du Bourget lui-même. Un modèle mathématique de prévision des apports massifs de fragments de biofilms (et donc potentiellement, de *Lpn*) au niveau du débouché de la Chaudanne dans le lac a effectivement été mis au point. Arrivés dans le lac, les fragments de biofilms, plus ou moins chargés en *Lpn*, peuvent alors être repris par la pompe qui alimente un jet d'eau en face de la plage municipale d'Aix les Bains et être ainsi aérosolisés.

L'outil mis au point doit servir de guide à l'équipe technique de la CALB pour la décision de mise en route ou d'arrêt du jet d'eau. Il s'agit d'un modèle du type pluie-débit calibré sur la partie aval du réseau aixois, couplé à une équation de transport de charges sur cette même partie du réseau. L'étude a permis de déterminer la valeur d'un débit d'alerte au-dessus duquel le cours d'eau est potentiellement chargé en fragments de biofilms et donc potentiellement aussi, en *Lpn*.

La calibration du modèle pourra être affinée sur la base de nouveaux enregistrements du débit et des précipitations. Il doit également être considéré comme un modèle évolutif qui peut être amélioré dans son écriture mais surtout dans l'ajustement du débit d'alerte, pour tenir compte des changements globaux de l'environnement.

Rappelons ici, une fois encore, que cette étude avait pour vocation d'être un travail exploratoire, relatif à la distribution de *Lpn* dans les biofilms de milieux naturels et relatif aux facteurs qui en régulent la présence. A ce titre, le travail réalisé ouvre de nombreuses perspectives dont nous énumérons ici celles qui nous paraissent essentielles :

- L'étude du réseau aixois pourrait tout d'abord être complétée par de nouvelles données acquises pendant des périodes plus courtes mais avec une plus grande fréquence, au pas de temps journalier et au pas de temps hebdomadaire, par exemple, pour mieux comprendre le devenir des charges organiques inertes et bactériennes issues des sources et de l'établissement thermal.
- Le dénombrement des amibes devrait être fait en distinguant les formes trophozoïtes des kystes et, si possible, à l'échelle de l'espèce, afin de mieux comprendre leur rôle dans les biofilms, en tant qu'hôtes pour les légionelles et/ou en tant que prédateurs.
- Il serait également intéressant de comparer, par sérotypage, les *Lpn* présentes en différents points du trajet du cours d'eau, avec celles présentes simultanément dans les eaux thermales (sources et bêche de rejet des Thermes Chevalley) pour mieux appréhender leur devenir à partir des principaux points d'apport (sources thermales, ruisseau du Tillet).
- Les résultats obtenus en réacteurs pourraient être complétés par de nouveaux essais pour tester l'interaction entre les deux facteurs, vitesse et température, ou simplement pour explorer une gamme plus large de vitesses et de températures. Les essais devraient être faits dans la galerie de la Chaudanne (pour bénéficier de l'alimentation des réacteurs, en continu, par l'eau du cours d'eau) et en testant simultanément deux vitesses afin d'en comparer les effets dans les conditions les plus semblables possible de "qualité" de biofilms et de qualité d'eau. Par ailleurs, la répétition des expériences devrait intégrer d'autres descripteurs, notamment pour la mesure d'éventuels changements de dominance procaryotique et/ou eucaryotique au sein des biofilms, durant les essais.

11 Bibliographie

- Abu Kwaik Y** (1996) The phagosome containing *Legionella pneumophila* within the protozoan *Hartmannella vermiformis* is surrounded by the rough endoplasmic reticulum. *Applied and Environmental Microbiology* **62**: 2022-2028.
- Abu Kwaik Y, Gao LY, Stone BJ, Venkataraman C & Harb OS** (1998) Invasion of protozoa by *Legionella pneumophila* and its role in bacterial ecology and pathogenesis. *Applied and Environmental Microbiology* **64**: 3127-3133.
- Adeleke A, Pruckler J, Benson R, Rowbotham T, Halablab M & Fields BS** (1996) *Legionella*-Like Amoebal Pathogens - Phylogenetic Status and Possible Role in Respiratory Disease. *Emerging Infectious Diseases* **2**: 225-230.
- Adeleke AA, Fields BS, Benson RF, et al.** (2001) *Legionella drozanskii* sp. nov., *Legionella rowbothamii* sp. nov. and *Legionella fallonii* sp. nov.: three unusual new *Legionella* species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **51**: 1151-1160.
- Aguilar-Díaz H, Carrero JC, Argüello-García R, Laclette JP & Morales-Montor J** (2011) Cyst and encystment in protozoan parasites: optimal targets for new life-cycle interrupting strategies? *Trends in Parasitology* **In Press, Corrected Proof**.
- Allegra S, Berger F, Berthelot P, Grattard F, Pozzetto B & Riffard S** (2008) Use of Flow Cytometry To Monitor *Legionella* Viability. *Applied and Environmental Microbiology* **74**: 7813-7816.
- Allegra S, Grattard F, Girardot F, Riffard S, Pozzetto B & Berthelot P** (2011) Longitudinal Evaluation of the Efficacy of Heat Treatment Procedures against *Legionella* spp. in Hospital Water Systems by Using a Flow Cytometric Assay. *Applied and Environmental Microbiology* **77**: 1268-1275.
- Alleron L, Merlet N, Lacombe C & Frère J** (2008) Long-term survival of *Legionella pneumophila* in the viable but nonculturable state after monochloramine treatment. *Current Microbiology* **57**: 497-502.
- Araya R, Tani K, Takagi T, Yamaguchi N & Nasu M** (2003) Bacterial activity and community composition in stream water and biofilm from an urban river determined by fluorescent in situ hybridization and DGGE analysis. *FEMS Microbiology Ecology* **43**: 111-119.
- Atlas RM** (1999) *Legionella* : from environmental habitats to disease pathology, detection and control. *Environmental Microbiology* **1**: 283-293.
- Augsburger C, Karwautz C, Musmann M, Daims H & Battin TJ** (2010) Drivers of bacterial colonization patterns in stream biofilms. *FEMS Microbiology Ecology* **72**: 47-57.
- Bachman MA & Swanson MS** (2001) RpoS co-operates with other factors to induce *Legionella pneumophila* virulence in the stationary phase. *Molecular Microbiology* **40**: 1201-1214.
- Bachman MA & Swanson MS** (2004) Genetic Evidence that *Legionella pneumophila* RpoS Modulates Expression of the Transmission Phenotype in Both the Exponential Phase and the Stationary Phase. *Infect. Immun.* **72**: 2468-2476.
- Bandyopadhyay P, Liu S, Gabbai CB, Venitelli Z & Steinman HM** (2007) Environmental Mimics and the Lvh Type IVA Secretion System Contribute to Virulence-Related Phenotypes of *Legionella pneumophila*. *Infect. Immun.* **75**: 723-735.
- Barbaree JM, Fields BS, Feeley JC, Gorman GW & Martin WT** (1986) Isolation of protozoa from water associated with associated with a Legionellosis outbreak and demonstration of intracellular multiplication of *Legionella pneumophila*. *Applied and Environmental Microbiology* **51**: 422-424.
- Barbeau J, Gauthier C & Payment P** (1998) Biofilms, infectious agents, and dental unit waterlines: a review. *Canadian Journal of Microbiology* **44**: 1019-1028.
- Barer MR & Harwood CR** (1999) Bacterial Viability and Culturability. *Advances in Microbial Physiology*, Vol. Volume 41 (Poole RK, ed.), pp. 93-137. Academic Press.

- Barker J, Lambert PA & Brown MRW** (1993) Influence of intra-amoebic and other growth conditions on the surface properties of *Legionella pneumophila*. *Infection and Immunity* **61**: 3503-3510.
- Barker J, Scaife H & Brown MRW** (1995) Intraphagocytic Growth Induces an Antibiotic-Resistant Phenotype of *Legionella pneumophila*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **39**: 2684-2688.
- Barker J, Brown MRW, Collier PJ, Farrell I & Gilbert P** (1992) Relationship between *Legionella pneumophila* and *Acanthamoeba polyphaga* : physiological status and susceptibility to chemical inactivation. *Applied and Environmental Microbiology* **58**: 2420-2425.
- Battin TJ, Butturini A & Sabater S** (1999) Immobilization and metabolism of dissolved organic carbon by natural sediment biofilms in Mediterranean and temperate stream. *Aquatic Microbial Ecology* **19**: 297-305.
- Battin TJ, Kaplan LA, Newbold JD & Hansen CME** (2003) Contribution of microbial biofilms to ecosystem processes in stream mesocosms. *Nature* **426**: 439.
- Battin TJ, Kaplan LA, Newbold JD, Cheng X & Hansen C** (2003) Effects of current velocity on the nascent architecture of stream microbial biofilms. *Applied and Environmental Microbiology* **69**: 5443-5452.
- Baules J & Laurent E** (2006) Evolution de la concentration en légionelles dans les biofilms de cours d'eau dans le bassin aixois. pp. 36.
- Behets J, Declerck P, Delaedt Y, Creemers B & Ollevier F** (2007) Development and evaluation of a Taqman duplex real-time PCR quantification method for reliable enumeration of *Legionella pneumophila* in water samples. *Journal of Microbiological Methods* **68**: 137-144.
- Belkhadir R, Capdeville B & Roques H** (1988) Etude descriptive fondamentale et modelisation d'un film biologique - I. Etude descriptive fondamentale de la croissance d'un film biologique. *Water Research* **22**: 59-69.
- Berg JD, Hoff JC, Roberts PV & Martin A** (1985) Growth of *Legionella pneumophila* in continuous culture. *Applied and Environmental Microbiology* **49**: 1534-1537.
- Berk SG, Ting RS, Turner GW & Ashburn RJ** (1998) Production of respirable vesicles containing live *Legionella pneumophila* cells by two *Acanthamoeba* spp.. *Applied and Environmental Microbiology* **64**: 279-286.
- Berk SG, Faulkner G, Garduno E, Joy MC, Ortiz-Jimenez MA & Garduno RA** (2008) Packaging of live *Legionella pneumophila* into pellets expelled by *Tetrahymena* spp. does not require bacterial replication and depends on a dot/icm-mediated survival mechanism. *Applied and Environmental Microbiology* **74**: 2187-2199.
- Besemer K, Singer G, Limberger R, et al.** (2007) Biophysical Controls on Community Succession in Stream Biofilms. *Applied and Environmental Microbiology* **73**: 4966-4974.
- Borella P, Guerrieri E, Marchesi I, Bondi M & Messi P** (2005) Water ecology of *Legionella* and protozoan: environmental and public health perspectives. *Biotechnology Annual Review* **11**: 355-380.
- Borella P, Montagna MT, Romano-Spica V, et al.** (2004) *Legionella* infection risk from domestic hot water. *Emerging Infectious Diseases* **10**: 457-464.
- Bornstein N, Marmet D, Surgot M, Arslan A, Esteve J & Fleurette J** (1989) Exposure to *Legionellaceae* at a hot spring spa: a prospective clinical and serological study. *Epidemiology and Infection* **102**: 31-36.
- Bouvier T & Del Giorgio PA** (2003) Factors influencing the detection of bacterial cells using fluorescence in situ hybridization (FISH): A quantitative review of published reports. *FEMS Microbiology Ecology* **44**: 3-15.
- Bouyer S, Imbert C, Rodier MH & Héchard Y** (2007) Long-term survival of *Legionella pneumophila* associated with *Acanthamoeba castellanii* vesicles. *Environmental Microbiology* **9**: 1341-1344.

- Bozue JA & Johnson W** (1996) Interaction of *Legionella pneumophila* with *Acanthamoeba castellanii* : uptake by coiling phagocytosis and inhibition of phagosome-lysosome fusion. *Infection and Immunity* **64**: 668-673.
- Brassinga AKC, Kinchen JM, Cupp ME, Day SR, Hoffman PS & Sifri CD** (2010) *Caenorhabditis* is a metazoan host for *Legionella*. *Cellular Microbiology* **12**: 343-361.
- Brieland JK, Fantone JC, Remick DG, LeGendre M, McClain M & Engleberg NC** (1997) The Role of *Legionella pneumophila*-infected *Hartmannella vermiformis* as an infectious particle in a murine model of Legionnaires' disease. *Infection and Immunity* **65**: 5330-5333.
- Brooks T, Osicki RA, Springthorpe VS, Sattar SA, Filion L, Abrial D & Riffard S** (2004) Detection and identification of *Legionella* species from groundwater. *Journal of toxicology and environmental Health* **67**: 1845-1859.
- Brown VI & Lowbury JL** (1965) Use of an improved cetrimide agar medium and other culture methods for *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of clinical pathology* **18**: 752-756.
- Bryers JD** (1982) Processes governing primary biofilm formation. *Biotechnology and Bioengineering* **24**: 2451-2476.
- Byrne B & Swanson MS** (1998) Expression of *Legionella pneumophila* virulence traits in response to growth conditions. *Infection and Immunity* **66**: 3029-3034.
- Campèse C, Jarraud S, Maine C & Che D** (2011) La légionellose en France: augmentation du nombre de cas en 2010. *Bulletin Épidémiologique Hebdomadaire (InVS)* **29-30**: 325-327.
- Caron DA** (1983) Technique for Enumeration of Heterotrophic and Phototrophic Nanoplankton, Using Epifluorescence Microscopy, and Comparison with Other Procedures. *Applied and Environmental Microbiology* **46**: 491-498.
- Characklis WG** (1981) Fouling biofilm development: a process analysis. *Biotechnology and Bioengineering* **23**: 1923-1960.
- Characklis WG & Marshall KC** (1990) Biofilms. Vol. 1 (Mitchell R, ed.), pp. 796. Wiley Interscience.
- Chenier MR, Beaumier D, Roy R, Driscoll BT, Lawrence JR & Greer CW** (2003) Impact of Seasonal Variations and Nutrient Inputs on Nitrogen Cycling and Degradation of Hexadecane by Replicated River Biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 5170-5177.
- Chenier MR, Beaumier D, Roy R, Driscoll BT, Lawrence JR & Greer CW** (2006) Influence of nutrients, hexadecane, and temporal variations on nitrification and exopolysaccharide composition of river biofilms. *Canadian Journal of Microbiology* **52**: 786-797.
- Chenier MR, Beaumier D, Fortin N, Roy R, Driscoll BT, Lawrence JR & Greer CW** (2006) Influence of Nutrient Inputs, Hexadecane, and Temporal Variations on Denitrification and Community Composition of River Biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**: 575-584.
- Christensen H, Hansen M & Sorensen J** (1999) Counting and Size Classification of Active Soil Bacteria by Fluorescence In Situ Hybridization with an rRNA Oligonucleotide Probe. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 1753-1761.
- Cianciotto NP** (2005) Type II secretion: a protein secretion system for all seasons. *Trends in Microbiology* **13**: 581-588.
- Cianciotto NP** (2009) Many substrates and functions of type II secretion: lessons learned from *Legionella pneumophila*. *Future Microbiology* **4**: 797-805.
- Cianciotto NP & Fields BS** (1992) *Legionella pneumophila* mip gene potentiates intracellular infection of protozoa and human macrophage. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **89**: 5188-5191.
- Cianciotto NP, Long R, Eisenstein BI & Engleberg NC** (1989) A *Legionella pneumophila* gene encoding a species-specific surface protein potentiates the initiation of intracellular infection. *Infection and Immunity* **57**: 1255-1262.
- Ciesielski CA, Blaser MJ & Wang WLL** (1986) Serogroup specificity of *Legionella pneumophila* is related to lipopolysaccharide characteristics. *Infection and Immunity* **51**: 397-404.
- Cirillo JD, Falkow S & Tompkins LS** (1994) Growth of *Legionella pneumophila* in *Acanthamoeba castellanii* enhances invasion. *Infection and Immunity* **62**: 3254-3261.

- Coers J, Monahan C & Roy CR** (1999) Modulation of phagosome biogenesis by *Legionella pneumophila* creates an organelle permissive for intracellular growth. *Nature Cell Biology* **1**: 451-453.
- Comte J, Jacquet S, Viboud S, Fontvieille D, Millery A, Paolini G & Domaizon I** (2006) Microbial Community Structure and Dynamics in the Largest Natural French Lake (Lake Bourget). *Microbial Ecology* **52**: 72-89.
- Costerton JW** (2007) *The biofilm primer*.
- Costerton JW, Stewart PS & Greenberg EP** (1999) Bacterial Biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* **284**: 1318-1322.
- Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell D, Korber D & Lappin-Scott HM** (1995) Microbial biofilms. *Annual Review Microbiology* **49**: 711-745.
- Créach V, Baudoux A-C, Bertru G & Rouzic BL** (2003) Direct estimate of active bacteria: CTC use and limitations. *Journal of Microbiological Methods* **52**: 19-28.
- Davey ME & O'Toole GA** (2000) Microbial biofilms : from ecology to molecular genetics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **64**: 847-867.
- Davies DG, Parsek MR, Pearson JP, Iglewski BH, Costerton JW & Greenberg EP** (1998) The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science* **280**: 295-297.
- De Beer D, Stoodley P & Lewandowski Z** (1996) Liquid flow and mass transport in heterogeneous biofilms. *Water Research* **30**: 2761-2765.
- De Kievit TR, Gillis R, Marx S, Brown C & Iglewski BH** (2001) Quorum-Sensing Genes in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms: Their Role and Expression Patterns. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 1865-1873.
- Declerck P** (2009) Biofilms: the environmental playground of *Legionella pneumophila*. *Environmental Microbiology*.
- Declerck P, Behets J, De Keersmaecker B & Ollevier F** (2007) Receptor-mediated uptake of *Legionella pneumophila* by *Acanthamoeba castellanii* et *Naegleria lovaniensis*. *Journal of Applied Microbiology* **103**: 2697-2703.
- Declerck P, Behets J, Van Hoef V & Ollevier F** (2007) Replication of *Legionella pneumophila* in floating biofilms. *Current Microbiology* **55**: 435-440.
- Declerck P, Behets J, Delaedt Y, Margineanu A, Lammertyn E & Ollevier F** (2005) Impact of Non-*Legionella* Bacteria on the uptake and intracellular replication of *Legionella pneumophila* in *Acanthamoeba castellanii* and *Naegleria lovaniensis*. *Microbial Ecology* **50**: 536-549.
- Dennis PJ, Green D & Jones BPC** (1984) A note on the temperature tolerance of *Legionella*. *Journal of Applied Bacteriology* **56**: 349-350.
- Devos L, Boon N & Verstraete W** (2005) *Legionella pneumophila* in the environment: the occurrence of a fastidious bacterium in oligotrophic conditions. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology* **4**: 61-74.
- Dey R, Bodennec J, Mameri MO & Pernin P** (2009) Free-living freshwater amoebae differ in their susceptibility to the pathogenic bacterium *Legionella pneumophila*. *FEMS Microbiology Letters* **290**: 10-17.
- Diaz Villanueva V, Font J, Schwartz T & Romani AM** (2011) Biofilm formation at warming temperature: acceleration of microbial colonization and microbial interactive effects. *Biofouling* **27**: 59-71.
- Diederer BMW** (2008) *Legionella* spp. and legionnaires' disease. *Journal of Infection* **56**: 1-12.
- Dietrich C, Heuner K, Brand BC, Hacker J & Steinert M** (2001) Flagellum of *Legionella pneumophila* Positively Affects the Early Phase of Infection of Eukaryotic Host Cells. *Infect. Immun.* **69**: 2116-2122.
- Dopheide A, Lear G, Stott R & Lewis G** (2011) Preferential Feeding by the Ciliates *Chilodonella* and *Tetrahymena* spp. and Effects of These Protozoa on Bacterial Biofilm Structure and Composition. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**: 4564-4572.

- Dusserre E, Ginevra C, Hallier-Soulier S, et al.** (2008) A PCR-Based Method for Monitoring *Legionella pneumophila* in Water Samples Detects Viable but Noncultivable *Legionellae* That Can Recover Their Cultivability. *Applied and Environmental Microbiology* **74**: 4817-4824.
- Elasri MO & Miller RV** (1999) Study of the response of a biofilm bacterial community to UV radiation. *Applied and Environmental Microbiology* **65**: 2025-2031.
- Engleberg NC, Carter C, Weber DR, Cianciotto NP & Eisenstein BI** (1989) DNA sequence of mip, a *Legionella pneumophila* gene associated with macrophage infectivity. *Infection and Immunity* **57**: 1263-1270.
- Fallon RJ** (1983) *Legionella* by the legion. *The Lancet* **322**: 1035.
- Faulkner G & Garduno RA** (2002) Ultrastructural analysis of differentiation in *Legionella pneumophila*. *Journal of Bacteriology* **184**: 7025-7041.
- Feeley JC, Gorman GW, Weaver RE, Mackel DC & Smith HW** (1978) Primary isolation media for Legionnaires disease bacterium. *Journal of clinical microbiology* **8**: 320-325.
- Feeley JC, Gibson RJ, Gorman GW, Langford NC, Rasheed JK, Mackel DC & Baine WB** (1979) Charcoal-yeast extract agar: primary isolation medium for *Legionella pneumophila*. *Journal of clinical microbiology* **10**: 437-441.
- Fields BS** (1996) The molecular ecology of legionellae. *Trends in Microbiology* **4**: 286-290.
- Fields BS, Benson RF & Besser RE** (2002) *Legionella* and Legionnaires' disease: 25 years of investigation. *Clinical Microbiology Reviews* **15**: 506-526.
- Fields BS, Shotts EB, Feeley JC, Gorman GW & Martin WT** (1984) Proliferation of *Legionella pneumophila* as an intracellular parasite of the ciliated protozoan *Tetrahymena pyriformis*. *Applied and Environmental Microbiology* **47**: 467-471.
- Flemming HC** (1993) Biofilms and environmental protection. *Water Science and Technology* **27**: 1-10.
- Fliermans CB, Cherry WB, Orrison LH & Thacker L** (1979) Isolation of *Legionella pneumophila* from Nonepidemic-related aquatic habitats. *Applied and Environmental Microbiology* **37**: 1239-1242.
- Fliermans CB, Cherry WB, Orrison LH, Smith SJ, Tison DL & Pope DH** (1981) Ecological distribution of *Legionella pneumophila*. *Applied and Environmental Microbiology* **41**: 9-16.
- Franco C, Esteban GF & Tellez C** (1998) Colonisation and succession of ciliated Protozoa associated with submerged leaves in a river. *Limnologia* **28**: 275-283.
- Fraser DW, Tsai TR, Orenstein W, et al.** (1977) Legionnaires' disease: description of an epidemic of pneumonia. *The New England Journal of Medicine* **297**: 1189-1197.
- Freeman C & Lock MA** (1995) The biofilm polysaccharide matrix: a buffer against changing organic substrate supply? *Limnology and Oceanography* **10**: 273-278.
- Fry NK, Afshar B, Bellamy W, Underwood AP, Ratcliff RM, Harrison TG & members of the European Working Group for Legionella I** (2007) Identification of *Legionella* spp. by 19 European reference laboratories: results of the European Working Group for *Legionella* Infections External Quality Assessment Scheme using DNA sequencing of the macrophage infectivity potentiator gene and dedicated online tools. *Clinical Microbiology and Infection* **13**: 1119-1124.
- Gallino S** (2006) Le karst du dôme anticlinal d'Aix-les-Bains : nouvelles données sur le panache hydrothermal. *Karstologia* **48**: 29-32.
- Gantzer CJ, Rittmann BE & Herricks EE** (1991) Effect of long-term water velocity changes on streambed biofilm activity. *Water Research* **25**: 15-20.
- Gao L, Harb O & Abu Kwaik Y** (1997) Utilization of similar mechanisms by *Legionella pneumophila* to parasitize two evolutionarily distant host cells, mammalian macrophages and protozoa. *Infect. Immun.* **65**: 4738-4746.
- Gao LY & Abu Kwaik Y** (2000) The mechanism of killing and exiting the protozoan host *Acanthamoeba polyphaga* by *Legionella pneumophila*. *Environmental Microbiology* **2**: 79-90.

- Garduno RA, Garduno E, Hiltz M & Hoffman PS** (2002) Intracellular growth of *Legionella pneumophila* gives rise to a differentiated form dissimilar to stationary-phase forms. *Infection and Immunity* **70**: 6273-6283.
- Geesey GG, Mutch R, Costerton JW & Green RB** (1978) Sessile bacteria: An important component of the microbial population in small mountain streams¹. *Limnology and Oceanography* **23**: 1214-1223.
- George JR, Pine L, Reeves MW & Harrell WK** (1980) Amino Acid Requirements of *Legionella pneumophila*. *Journal of Clinical Microbiology* **11**: 286-291.
- Gosting LH, Cabrian K, Sturge JC & Goldstein LC** (1984) Identification of a species-specific antigen in *Legionella pneumophila* by a monoclonal antibody. *Journal of clinical microbiology* **20**: 1031-1035.
- Greub G & Raoult D** (2003) Morphology of *Legionella pneumophila* according to their location within *Hartmanella vermiformis*. *Research in Microbiology* **154**: 619-621.
- Grimm D, Merkert H, Ludwig W, Schleifer KH, Hacker J & Brand BC** (1998) Specific detection of *Legionella pneumophila* : construction of a new 16S rRNA-targeted oligonucleotide probe. *Applied and Environmental Microbiology* **64**: 2686-2690.
- Guerrieri E, Bondi M, Sabia C, De Niederhäusern S, Borella P & Messi P** (2008) Effect of bacterial interference on biofilm development by *Legionella pneumophila*. *Current Microbiology* **57**: 532-536.
- Haack TK & McFeters GA** (1982) Nutritional relationships among microorganisms in an epilithic biofilm community. *Microbial Ecology* **8**: 115-126.
- Hägele S, Hacker J & Brand BC** (1998) *Legionella pneumophila* kills human phagocytes but not protozoan host cells by inducing apoptotic cell death. *FEMS Microbiology Letters* **169**: 51-58.
- Hägele S, Köhler R, Merkert H, Schleicher M, Hacker J & Steinert M** (2000) *Dictyostelium discoideum*: a new host model system for intracellular pathogens of the genus *Legionella*. *Cellular Microbiology* **2**: 165-171.
- Hales LM & Shuman HA** (1999) The *Legionella pneumophila* rpoS Gene Is Required for Growth within *Acanthamoeba castellanii*. *J. Bacteriol.* **181**: 4879-4889.
- Hales LM & Shuman HA** (1999) *Legionella pneumophila* contains a type II general secretion pathway required for growth in amoeba as well as for secretion of the Msp protease. *Infection and Immunity* **67**: 3662-3666.
- Hammer BK & Swanson MS** (1999) Co-ordination of *Legionella pneumophila* virulence with entry into stationary phase by ppGpp. *Molecular Microbiology* **33**: 721-731.
- Hécharde Y, Ferraz S, Bruneteau E, Steinert M & Berjeaud JM** (2005) Isolation and characterization of a *Staphylococcus warneri* strain producing an anti-*Legionella* peptide. *FEMS Microbiology Letters* **252**: 19-23.
- Heidelberg JF, Shahamat M, Levin M, Rahman I, Stelma G, Grim C & Colwell RR** (1997) Effect of aerosolization on culturability and viability of Gram Negative bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **63**: 3585-3588.
- Helbig JH, Lück PC, Kunz B & Bubert A** (2006) Evaluation of the Duopath *Legionella* Lateral Flow Assay for Identification of *Legionella pneumophila* and *Legionella* Species Culture Isolates. *Applied and Environmental Microbiology* **72**: 4489-4491.
- Heller R, Heller C, Szlamuth R & Gundermann KO** (1998) Effect of salt concentration and temperature on survival of *Legionella pneumophila*. *Letters in Applied Microbiology* **26**: 64-68.
- Henrici AT** (1933) Studies of Freshwater Bacteria: I. A Direct Microscopic Technique. *J. Bacteriol.* **25**: 277-287.
- Heuner K & Steinert M** (2003) The flagellum of *Legionella pneumophila* and its link to the expression of the virulent phenotype. *International Journal of Medical Microbiology* **293**: 133-143.

- Heuner K, Brand BC & Hacker J (1999) The expression of the flagellum of *Legionella pneumophila* is modulated by different environmental factors. *FEMS Microbiology Letters* **175**: 69-77.
- Heuner K, Dietrich C, Skriwan C, Steinert M & Hacker J (2002) Influence of the Alternative σ^{28} Factor on Virulence and Flagellum Expression of *Legionella pneumophila*. *Infect. Immun.* **70**: 1604-1608.
- Heuner K, Bender-Beck L, Brand BC, *et al.* (1995) Cloning and genetic characterization of the flagellum subunit gene (*flaA*) of *Legionella pneumophila* serogroup 1. *Infection and Immunity* **63**: 2499-2507.
- Hilbi H, Jarraud S, Hartland E & Buchrieser C (2010) Update on Legionnaires' disease: pathogenesis, epidemiology, detection and control. *Molecular Microbiology* **76**: 1-11.
- Hoellein TJ, Tank JL, Kelly JJ & Rosi-Marshall EJ (2010) Seasonal variation in nutrient limitation of microbial biofilms colonizing organic and inorganic substrata in streams. *Hydrobiologia* **649**: 331-345.
- Holden EP, Winkler HH, Wood DO & Leinbach ED (1984) Intracellular growth of *Legionella pneumophila* within *Acanthamoeba castellanii* Neff. *Infection and Immunity* **45**: 18-24.
- Horn H, Reiff H & Morgenroth E (2003) Simulation of growth and detachment in biofilm systems under defined hydrodynamic conditions. *Biotechnology and Bioengineering* **81**: 607-617.
- Horwitz MA (1984) Phagocytosis of the Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) occurs by a novel mechanism: engulfment with a pseudopod coil. *Cell* **36**: 27-33.
- Howard-Jones MH, Frischer ME & Verity PG (2001) Determining the physiological status of individual bacterial cells. *Methods in Microbiology* **30**: 175-206.
- Huang SW, Hsu BM, Wu SF, Fan CW, Shih FC, Lin YC & Ji DD (2010) Water quality parameters associated with prevalence of *Legionella* in hot spring facility water bodies. *Water Research* **44**: 4805-4811.
- Hunt AP & Parry JD (1998) The effect of substratum roughness and river flow rate on the development of a freshwater biofilm community. *Biofouling* **12**: 287-303.
- Hunt SM, Werner EM, Huang B, Hamilton MA & Stewart PS (2004) Hypothesis for the role of nutrient starvation in biofilm detachment. *Applied and Environmental Microbiology* **70**: 7418-7425.
- Hussong D, Colwell RR, O'Brien M, Weiss E, Pearson AD, Weiner RM & Burge WD (1987) Viable *Legionella pneumophila* not culturable by culture on agar medium. *BioTechnology* **5**: 947-950.
- Jackson CR, Churchill PF & Roden EE (2001) Successional changes in bacterial assemblage structure during epilithic biofilm development. *Ecology* **82**: 555-566.
- Jacobi S & Heuner K (2003) Description of a putative type I secretion system in *Legionella pneumophila*. *International Journal of Medical Microbiology* **293**: 349-358.
- Jarraud S & Freney J (2011) *Legionella*, 2^e édition. Lavoisier.
- Jefferson KK (2004) What drives bacteria to produce a biofilm? *FEMS Microbiology Letters* **236**: 163-173.
- Johannes RE (1965) Influence of marine protozoa on nutrient regeneration. *Limnology and Oceanography* **10**: 434-442.
- Joly P, Falconnet PA, Andr, J, *et al.* (2006) Quantitative real-time *Legionella* PCR for environmental water samples: data interpretation. *Applied and Environmental Microbiology* **72**: 2801-2808.
- Joseph CA, Ricketts KD & EWGLI (2010) Legionnaires' disease in Europe 2007-2008. *Euro Surveillance* **15**: 1-8.
- Joux F & LeBaron P (1997) Ecological implication of an improved Direct Viable Count method for aquatic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **63**: 3643-3647.
- Joux F & LeBaron P (2000) Use of fluorescent probes to assess physiological functions of bacteria at single-cell level. *Microbes and Infection* **2**: 1523-1535.

- Karatan E & Watnick P** (2009) Signals, Regulatory Network and Materials that build and break bacterial biofilms. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **73**: 310-347.
- Kathol M, Norf H, Arndt H & Weitere M** (2009) Effects of temperature increase on the grazing of planktonic bacteria by biofilm-dwelling consumers. *Aquatic Microbial Ecology* **55**: 65-79.
- Kilvington SP, J.** (1990) Survival of *Legionella pneumophila* within cysts of *Acanthamoeba polyphaga* following chlorine exposure. *Journal of Applied Bacteriology* **68**: 519-525.
- Kim E-H, Charpentier X, Torres-Urquidy O, McEvoy MM & Rensing C** (2009) The metal efflux island of *Legionella pneumophila* is not required for survival in macrophages and amoebas. *FEMS Microbiology Letters* **301**: 164-170.
- Kimura S, Tateda K, Ishii Y, et al.** (2009) *Pseudomonas aeruginosa* Las quorum sensing autoinducer suppresses growth and biofilm production in *Legionella* species. *Microbiology* **155**: 1934-1939.
- KIWA** (2008) Efficacité du cuivre contre la legionellose? Un nouveau rapport Kiwa Water Research. pp. 3.
- Kogure K, Simidu U & Taga N** (1979) A tentative direct microscopic method for counting living marine bacteria. *Canadian Journal of Microbiology* **25**: 415-420.
- Kolodkin-Gal I, Romero D, Cao S, Clardy J, Kolter R & Losick R** (2010) D-Amino Acids Trigger Biofilm Disassembly. *Science* **328**: 627-629.
- Kolter R & Losick R** (1998) One for all and all for one. *Science* **280**: 226-227.
- Konishi T, Yamashiro T, Koide M & Nishizono A** (2006) Influence of temperature on growth of *Legionella pneumophila* biofilm determined by precise temperature gradient incubator. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **101**: 478-484.
- Kröpfel K, Vladár P, Szabó K, et al.** (2006) Chemical and biological characterisation of biofilms formed on different substrata in Tisza river (Hungary). *Environmental Pollution* **144**: 626-631.
- Kusnetsov JM, Ottoila E & Martikainen PJ** (1996) Growth, respiration and survival of *Legionella pneumophila* at high temperatures. *Journal of Applied Microbiology* **81**: 341-347.
- Kwok WK, Picioreanu C, Ong SL, Van Loosdrecht MCM, Ng WJ & Heijnen JJ** (1998) Influence of biomass production and detachment forces on biofilm structures in a biofilm airlift suspension reactor. *Biotechnology and Bioengineering* **58**: 400-407.
- Lammertyn E & Ann, J** (2004) Protein secretion in *Legionella pneumophila* and its relation to virulence. *FEMS Microbiology Letters* **238**: 273-279.
- Lau YL & Liu D** (1993) Effect of flow rate on biofilm accumulation in open channels. *Water Research* **27**: 355-360.
- Lau YL & Ashbolt NJ** (2009) The role of biofilms and protozoa in *Legionella* pathogenesis: implications for drinking water. *Journal of Applied Microbiology* **107**: 368-378.
- Lawrence JR & Caldwell DE** (1987) Behavior of bacterial stream populations within the hydrodynamic boundary layers of surface microenvironments. *Microbial Ecology* **14**: 15-27.
- Lawrence JR, Korber DR, Hoyle BD, Costerton JW & Caldwell DE** (1991) Optical Sectioning of Microbial Biofilms. *Journal of Bacteriology* **173**: 6558-6567.
- Lazar V** Quorum sensing in biofilms - How to destroy the bacterial citadels or their cohesion/power? *Anaerobe In Press, Corrected Proof*.
- Lear G, Anderson MJ, Smith JP, Boxen K & Lewis GD** (2008) Spatial and temporal heterogeneity of the bacterial communities in stream epilithic biofilms. *FEMS Microbiology Ecology* **65**: 463-473.
- Legendre P & Legendre L** (1998) *Numerical Ecology*. Elsevier.
- Leoni E, De Luca G, Legnani PP, Sacchetti R, Stampi S & Zanetti F** (2005) *Legionella* waterline colonization: detection of *Legionella* species in domestic, hotel and hospital hot water systems. *Journal of Applied Microbiology* **98**: 373-379.
- Levi K, Smedley J & Towner JK** (2003) Evaluation of a real-time PCR hybridization assay for rapid detection of *Legionella pneumophila* in hospital and environmental water samples. *Clinical Microbiology and Infection* **9**: 754-758.

- Lew S, Lew M, Mieszczyński T & Szarek J** (2010) Selected Fluorescent Techniques for identification of the physiological state of individual water and soil bacterial cells. *Folia Microbiology* **55**: 107-118.
- Lewandowski Z & Stoodley P** (1995) Flow induced vibrations, drag force, and pressure drop in conduits covered with biofilm. *Water Science and Technology* **32**: 19-26.
- Liles MR, Viswanathan VK & Cianciotto NP** (1998) Identification and temperature regulation of *Legionella pneumophila* genes involved in type IV pilus biogenesis and type II protein secretion. *Infection and Immunity* **66**: 1776-1782.
- Liles MR, Edelstein PH & Cianciotto NP** (1999) The prepilin peptidase is required for protein secretion by and the virulence of the intracellular pathogen *Legionella pneumophila*. *Molecular Microbiology* **31**: 959-970.
- Liu D, Lau YL, Chau YK & Pacepavicius GJ** (1993) Characterization of biofilm development on artificial substratum in natural water. *Water Research* **27**: 361-367.
- Liu Z, Lin YE, Stout JE, Hwang CC, Vidic RD & Yu VL** (2006) Effect of flow regimes on the presence of *Legionella* within the biofilm of a model plumbing system. *Journal of Applied Microbiology* **101**: 437-442.
- Lucas CE, Brown E & Fields BS** (2006) Type IV pili and type II secretion play a limited role in *Legionella pneumophila* biofilm colonization and retention. *Microbiology* **152**: 3569-3573.
- Lyautey E, Jackson CR, Cayrou J, Rols JL & Garabetian F** (2005) Bacterial Community Succession in Natural River Biofilm Assemblages. *Microbial Ecology* **50**: 589-601.
- Mah TFC & O'Toole GA** (2001) Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends in Microbiology* **9**: 34-39.
- Mampel J, Spirig T, Weber SS, Haagensen JAJ, Molin S & Hilbi H** (2006) Planktonic replication is essential for biofilm formation by *Legionella pneumophila* in a complex medium under static and dynamic flow conditions. *Applied and Environmental Microbiology* **72**: 2885-2895.
- Manz W, Wendt-Potthoff K, Neu TR, Szewzyk U & Lawrence JR** (1999) Phylogenetic Composition, Spatial Structure, and Dynamics of Lotic Bacterial Biofilms Investigated by Fluorescent *in Situ* Hybridization and Confocal Laser Scanning Microscopy. *Microbial Ecology* **37**: 225-237.
- Marrie TJ, Raoult D, La Scola B, Birtles RJ, De Carolis E & Group TCC-APS** (2001) *Legionella*-Like and Other Amoebal Pathogens as Agents of Community-Acquired Pneumonia. *Emerging Infectious Diseases* **7**: 1026-1029.
- Mauchline WS, Araujo R, Wait R, Dowsett AB, Dennis PJ & Keevil CW** (1992) Physiology and morphology of *Legionella pneumophila* in continuous culture at low oxygen concentration. *Journal of general microbiology* **138**: 2371-2380.
- McDade JE, Shepard CC, Fraser DW, Tsai TR, Redus MA & Dowdle WR** (1977) Legionnaires' disease: isolation of bacterium and demonstration of its role in other respiratory disease. *The New England Journal of Medicine* **297**: 1197-1203.
- McDougald D, Rice SA, Weichert D & Kjelleberg S** (1998) Nonculturability : adaptation or debilitation? *FEMS Microbiology Ecology* **25**: 1-9.
- McKinney RM, Thomason BM, Harris PP, et al.** (1979) Recognition of a new serogroup of legionnaires disease bacterium. *Journal of clinical microbiology* **9**: 103-107.
- McLean RJC, Whiteley M, Stickler DJ & Fuqua WC** (1997) Evidence of autoinducer activity in naturally occurring biofilms. *FEMS Microbiology Letters* **154**: 259-263.
- Moffat JF & Tompkins LS** (1992) A quantitative model of intracellular growth of *Legionella pneumophila* in *Acanthamoeba castellanii*. *Infect. Immun.* **60**: 296-301.
- Moller S, Korber D, Wolfaardt G, Molin S & Caldwell D** (1997) Impact of Nutrient Composition on a Degradative Biofilm Community. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 2432-2438.
- Molmeret M, Bitar DM, Han L & Abu Kwaik Y** (2004) Cell biology of the intracellular infection by *Legionella pneumophila*. *Microbes and Infection* **6**: 129-139.
- Molmeret M, Horn M, Wagner M, Santic M & Abu Kwaik Y** (2005) Amoeba as training grounds for intracellular bacterial pathogens. *Applied and Environmental Microbiology* **71**: 20-28.

- Molmeret M, Alli OAT, Zink S, Flieger A, Cianciotto NP & Abu Kwaik Y** (2002) icmT is essential for pore formation-mediated egress of *Legionella pneumophila* from mammalian and protozoan cells. *Infection and Immunity* **70**: 69-78.
- Molmeret M, Jarraud S, Morin JP, et al.** (2001) Different growth rates in amoeba of genotypically related environmental and clinical *Legionella pneumophila* strains isolated from a thermal spa. *Epidemiology and Infection* **126**: 231-239.
- Molofsky AB & Swanson MS** (2003) *Legionella pneumophila* CsrA is a pivotal repressor of transmission traits and activator of replication. *Molecular Microbiology* **50**: 445-461.
- Molofsky AB & Swanson MS** (2004) Differentiate to thrive: five lessons from the *legionella pneumophila* life cycle. *Molecular Microbiology* **53**: 29-40.
- Monds RD & O'Toole GA** (2009) The developmental model of microbial biofilms: ten years of a paradigm up for review. *Trends in Microbiology* **17**: 73-87.
- Montanaro L, Poggi A, Visai L, Ravaoli S, Campoccia D, Speziale P & Arciola CR** (2011) Extracellular DNA in biofilms. *International Journal of Artificial Organs* **34**: 824-831.
- Moss W, Weaver RE, Dees SB & Cherry WB** (1977) Cellular fatty acid composition of isolates from legionnaires disease. *Journal of clinical microbiology* **6**: 140-143.
- Murga R, Forster TS, Brown H, Pruckler JM, Fields BS & Donlan RM** (2001) Role of biofilms in the survival of *Legionella pneumophila* in a model potable-water system. *Microbiology* **147**: 3121-3126.
- Newsome AL, Baker RL, Miller RD & Arnold RR** (1985) Interactions between *Naegleria fowleri* and *Legionella pneumophila*. *Infection and Immunity* **50**: 449-452.
- Nielsen AT, Tolker-Nielsen T, Barken KB & Molin S** (2000) Role of commensal relationships on the spatial structure of a surface-attached microbial consortium. *Environmental Microbiology* **2**: 59-68.
- Nikolaev YA & Plakunov VK** (2007) Biofilm - "City of Microbes" or an Analogue of Multicellular Organisms? *Microbiology* **76**: 125-138.
- Norf H, Arndt H & Weitere M** (2007) Impact of local temperature increase on the early development of biofilm-associated ciliate communities. *Oecologia* **151**: 341-350.
- Nunez ME, Martin MO, Chan PH & Spain EM** (2005) Predation, death, and survival in a biofilm: *Bdellovibrio* investigated by atomic force microscopy. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **42**: 263-271.
- Nygård K, Werner-Johansen O, Ronsen S, et al.** (2008) An outbreak of Legionnaires disease caused by long-distance spread from an industrial air scrubber in Sarpsborg, Norway. *Clinical Infectious Diseases* **46**: 61-69.
- O'Toole G, Kaplan HB & Kolter R** (2000) Biofilm formation as microbial development. *Annual Review Microbiology* **54**: 49-79.
- O'Toole GA & Kolter R** (1998) Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Molecular Microbiology* **30**: 295-304.
- Ohno A, Kato N, Yamada K & Yamaguchi K** (2003) Factors influencing survival of *Legionella pneumophila* serotype 1 in hot spring water and tap water. *Applied and Environmental Microbiology* **69**: 2540-2547.
- Olapade OA & Leff LG** (2006) Influence of dissolved organic matter and inorganic nutrients on the biofilm bacterial community on artificial substrates in a northeastern Ohio, USA, stream. *Canadian Journal of Microbiology* **52**: 540-549.
- Oliver JD** (2005) The viable but nonculturable state in bacteria. *The journal of Microbiology* **43**: 93-100.
- Orrison LH, Cherry WB, Fliermans CB, Dees SB, McDougal LK & Dodd DJ** (1981) Characteristic of environmental isolates of *Legionella pneumophila*. *Applied and Environmental Microbiology* **41**: 109-115.
- Ott M, Messner P, Heesemann J, Marre R & Hacker J** (1991) Temperature-dependent expression of flagella in *Legionella*. *Journal of general microbiology* **137**: 1955-1961.

- Otten S, Iyer S, Johnson W & Montgomery R (1986) Serospecific antigens of *Legionella pneumophila*. *Journal of Bacteriology* **167**: 893-904.
- Parry JD (2004) Protozoan grazing of freshwater biofilms. *Advances in Applied Microbiology* **54**: 167-196.
- Paszko-Kolva C, Shahamat M & Colwell RR (1993) Effect of temperature on survival of *Legionella pneumophila* in the aquatic environment. *Microbial Releases* **2**: 73-79.
- Pedersen K (1982) Method for studying in microbial biofilms in flowing-water systems. *Applied and Environmental Microbiology* **43**: 6-13.
- Piao Z, Sze CC, Barysheva O, Iida KI & Yoshida SI (2006) Temperature-Regulated Formation of Mycelial Mat-Like Biofilms by *Legionella pneumophila*. *Applied and Environmental Microbiology* **72**: 1613-1622.
- Pine L, George JR, Reeves MW & Harrell WK (1979) Development of a chemically defined liquid medium for growth of *Legionella pneumophila*. *Journal of clinical microbiology* **9**: 615-626.
- Piton G (2010) Assistance et modélisation hydrologique : Ruisseaux de la chaudière et du Tillet. (Sogreah), pp. 1-15. Sogreah.
- Pohlen E, Marxsen J & Küsel K (2010) Pioneering bacterial and algal communities and potential extracellular enzyme activities of stream biofilms. *FEMS Microbiology Ecology* **71**: 364-373.
- Polesky AH, Ross JTD, Falkow S & Tompkins LS (2001) Identification of *Legionella pneumophila* Genes Important for Infection of Amoebas by Signature-Tagged Mutagenesis. *Infect. Immun.* **69**: 977-987.
- Porter KG & Feig YS (1980) The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnology and Oceanography* **25**: 943-948.
- Quay A (2009) Contribution à l'étude de la survie de bactéries issues d'installations humaines à leur arrivée dans un cours d'eau récepteur :
- Etude hydrographique et suivi de la charge solide en suspension d'un cours d'eau.
 - Influence de la température sur le développement des biofilms. pp. 33.
- Reyrolle M, Ratat C, Leportier M, Jarraud S, Freney J & Etienne J (2004) Rapid identification of *Legionella pneumophila* serogroups by latex agglutination. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* **23**: 864-866.
- Rice AR, Hamilton MA & Camper AK (2003) Movement, Replication, and Emigration Rates of Individual Bacteria in a Biofilm. *Microbial Ecology* **45**: 163-172.
- Rickard AH, McBain AJ, Stead AT & Gilbert P (2004) Shear rate modulates community diversity in freshwater biofilms. *Applied and Environmental Microbiology* **70**: 7426-7435.
- Riffard S, Brooks SD, Springthorpe S, Filion LG & Sattar SA (2001) Occurrence of *Legionella* in groundwater: an ecological study. *Water Science and Technology* **43**: 99-102.
- Risse-Buhl U & Küsel K (2009) Colonization dynamics of biofilm-associated ciliate morphotypes at different flow velocities. *European Journal of Protistology* **45**: 64-76.
- Rochex A, Godon JJ, Bernet N & Escudié R (2008) Role of shear stress on composition, diversity and dynamics of biofilm bacterial communities. *Water Research* **42**: 4915-4922.
- Rodgers FG (1979) Ultrastructure of *Legionella pneumophila*. *Journal of clinical pathology* **32**: 1195-1202.
- Rodgers FG & Davey MR (1982) Ultrastructure of the cell envelope layers and surface details of *Legionella pneumophila*. *Journal of general microbiology* **128**: 1547-1557.
- Rodgers FG, Greaves PW & Macrae AD (1979) Flagella and Fimbriae on *Legionella* organisms. *The Lancet* **314**: 753-754.
- Rodriguez GG, Phipps D, Ishiguro K & Ridgway HF (1992) Use of a fluorescent redox probe for direct visualization of actively respiring bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **58**: 1801-1808.
- Rogers J & Keevil CW (1992) Immunogold and fluorescein immunolabelling of *Legionella pneumophila* within an aquatic biofilm visualized by using episcopic differential interference contrast microscopy. *Applied and Environmental Microbiology* **58**: 2326-2330.

- Rogers J, Dowsett AB, Dennis PJ, Lee JV & Keevil CW** (1994) Influence of temperature and plumbing material selection on biofilm formation and growth of *Legionella pneumophila* in a model potable water system containing complex microbial flora. *Applied and Environmental Microbiology* **60**: 1585-1592.
- Romani AM, Fund K, Artigas J, Schwartz T, Sabater S & Obst U** (2008) Relevance of polymeric matrix enzymes during biofilm formation. *Microbial Ecology* **56**: 427-436.
- Rossier O & Cianciotto NP** (2001) Type II Protein Secretion Is a Subset of the PiLD-Dependent Processes That Facilitate Intracellular Infection by *Legionella pneumophila*. *Infection and Immunity* **69**: 2092-2098.
- Rossier O, Starkenburg SR & Cianciotto NP** (2004) *Legionella pneumophila* Type II Protein Secretion Promotes Virulence in the A/J Mouse Model of Legionnaires' Disease Pneumonia. *Infection and Immunity* **72**: 310-321.
- Rossier O, Dao J & Cianciotto NP** (2008) The Type II Secretion System of *Legionella pneumophila* Elaborates Two Aminopeptidases, as Well as a Metalloprotease That Contributes to Differential Infection among Protozoan Hosts. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**: 753-761.
- Rossier O, Dao J & Cianciotto NP** (2009) A type II secreted RNase of *Legionella pneumophila* facilitates optimal intracellular infection of *Hartmannella vermiformis*. *Microbiology* **155**: 882-890.
- Rowbotham TJ** (1980) Preliminary report on the pathogenicity of *Legionella pneumophila* for freshwater and soil amoebae. *Journal of Clinical Pathology* **33**: 1179-1183.
- Sakamoto R, Ohno A, Nakahara T, et al.** (2009) *Legionella pneumophila* in Rainwater on Roads. *Emerging Infectious Diseases* **15**: 1295-1297.
- Samrakandi MM, Ridenour DA, Yan L & Cirillo JD** (2002) Entry in host cells by *Legionella*. *Frontiers in Bioscience* **6**: d1-11.
- Schlech WF** (1990) *Legionella* and fountains. *The Lancet* **336**: 576.
- Segal G & Shuman HA** (1999) *Legionella pneumophila* utilizes the same genes to multiply within *Acanthamoeba castellanii* and human macrophages. *Infection and Immunity* **67**: 2117-2124.
- Segal G, Russo JJ & Shuman HA** (1999) Relationships between a new type IV secretion system and the icm/dot virulence system of *Legionella pneumophila*. *Molecular Microbiology* **34**: 799-809.
- Shadrach WS, Rydzewski K, Laube U, Holland G, Özel M, Kiderlen AF & Flieger A** (2005) *Balamuthia mandrillaris*, Free-Living Ameba and Opportunistic Agent of Encephalitis, Is a Potential Host for *Legionella pneumophila* Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **71**: 2244-2249.
- Sime-Ngando T, Hartmann HJ & Groliere CA** (1990) Rapid Quantification of Planktonic Ciliates: Comparison of Improved Live Counting with Other Methods. *Applied and Environmental Microbiology* **56**: 2234-2242.
- Skinner AR, Anand CM, Malic A & Kurtz JB** (1983) *Acanthamoeba* and environmental spread of *Legionella pneumophila*. *The Lancet* **322**: 289-290.
- Söderberg MA, Rossier O & Cianciotto NP** (2004) The type II protein secretion system of *Legionella pneumophila* promotes growth at low temperature. *Journal of Bacteriology* **186**: 3712-3720.
- Söderberg MA, Dao J, Starkenburg SR & Cianciotto NP** (2008) Importance of Type II Secretion for Survival of *Legionella pneumophila* in Tap Water and in Amoebae at Low Temperatures. *Applied and Environmental Microbiology* **74**: 5583-5588.
- Solomon JM & Isberg RR** (2000) Growth of *Legionella pneumophila* in *Dictyostelium discoideum*: a novel system for genetic analysis of host-pathogen interactions. *Trends in Microbiology* **8**: 478-480.
- Spirig T, Tieden A, Kiefer P, Buchrieser C, Vorholt JA & Hilbi H** (2008) The *Legionella* Autoinducer Synthase LqsA Produces an α -Hydroxyketone Signaling Molecule. *Journal of Biological Chemistry* **283**: 18113-18123.

- Spoering AL & Lewis K** (2001) Biofilms and Planktonic Cells of *Pseudomonas aeruginosa* Have Similar Resistance to Killing by Antimicrobials. *J. Bacteriol.* **183**: 6746-6751.
- Stanley NR & Lazazzera BA** (2004) Environmental signals and regulatory pathways that influence biofilm formation. *Molecular Microbiology* **52**: 917-924.
- States SJ, Conley LF, Ceraso M, et al.** (1985) Effects of metals on *Legionella pneumophila* growth in drinking water plumbing systems. *Applied and Environmental Microbiology* **50**: 1149-1154.
- Steinert M & Heuner K** (2005) *Dictyostelium* as host model for pathogenesis. *Cellular Microbiology* **7**: 307-314.
- Steinert M, Hentschel U & Hacker J** (2002) *Legionella pneumophila* : an aquatic microbe goes astray. *FEMS Microbiology Reviews* **26**: 149-162.
- Steinert M, Emödy L, Amann R & Hacker J** (1997) Resuscitation of viable but nonculturable *Legionella pneumophila* Philadelphia JR32 by *Acanthamoeba castellanii*. *Applied and Environmental Microbiology* **63**: 2047-2053.
- Steinert M, Heuner K, Buchrieser C, Albert-Weissenberger C & Glöckner G** (2007) *Legionella* pathogenicity: Genome structure, regulatory networks and the host cell response. *International Journal of Medical Microbiology* **297**: 577-587.
- Stewart CRR, O.; Cianciotto, N.P.** (2009) Surface translocation by *Legionella pneumophila*: a form of sliding motility that is dependant upon type II protein secretion. *Journal of Bacteriology* **191**: 1537-1546.
- Stewart PS** (1993) A model of Biofilm Detachment. *Biotechnology and Bioengineering* **41**: 111-117.
- Stewart PS** (2003) Diffusion in Biofilms. *journal of Bacteriology* **185**: 1485-1491.
- Stewart PS & Franklin MJ** (2008) Physiological heterogeneity in biofilms. *Nature Reviews Microbiology* **6**: 199-210.
- Stone BJ & Abu Kwaik Y** (1998) Expression of multiple pili by *Legionella pneumophila*: identification and characterization of a type IV pilin gene and its role in adherence to mammalian and protozoan cells. *Infection and Immunity* **66**: 1768-1775.
- Stoodley P, DeBeer D & Lewandowski Z** (1994) Liquid flow in biofilm systems. *Applied and Environmental Microbiology* **60**: 2711-2716.
- Stoodley P, Lewandowski Z, Boyle JD & Lappin-Scott HM** (1998) Oscillation characteristics of biofilm streamers in turbulent flowing water as related to drag and pressure drop. *Biotechnology and Bioengineering* **57**: 536-544.
- Stoodley P, Dodds I, Boyle JD & Lappin-Scott HM** (1999) Influence of hydrodynamics and nutrients on biofilm structure. *Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement* **85**: 19S-28S.
- Stoodley P, Sauer K, Davies DG & Costerton JW** (2002) Biofilms as complex differentiated communities. *Annual Review Microbiology* **56**: 187-209.
- Stoodley P, Wilson S, Hall-Stoodley L, Boyle JD, Lappin-Scott HM & Costerton JW** (2001) Growth and detachment of cell clusters from mature mixed-species biofilms. *Applied and Environmental Microbiology* **67**: 5608-5613.
- Stout JE, Yu VL & Best MG** (1985) Ecology of *Legionella pneumophila* within water distribution systems. *Applied and Environmental Microbiology* **49**: 221-228.
- Sutherland IW** (2001) The biofilm matrix - an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends in Microbiology* **9**: 222-227.
- Swanson MS & Hammer BK** (2000) *Legionella pneumophila* pathogenesis: a fateful journey from amoeba to macrophages. *Annual Review Microbiology* **54**: 567-613.
- Taylor MR, K.; Bantham, R.** (2009) *Legionella*, Protozoa, and Biofilms: Interactions Within Complex Microbial Systems. *Microbial Ecology* **58**: 538-547.
- Temmerman R, Vervaeren H, Nosedá B, Boon N & Verstraete W** (2006) Necrotrophic growth of *Legionella pneumophila*. *Applied and Environmental Microbiology* **72**: 4323-4328.

- Tiaden A, Spirig T & Hilbi H** (2010) Bacterial gene regulation by [alpha]-hydroxyketone signaling. *Trends in Microbiology* **18**: 288-297.
- Tiaden A, Spirig T, Weber SS, Brüggemann H, Bosshard R, Buchrieser C & Hilbi H** (2007) The *Legionella pneumophila* response regulator LqsR promotes host cell interactions as an element of the virulence regulatory network controlled by RpoS and LetA. *Cellular Microbiology* **9**: 2903-2920.
- Tiaden A, Spirig T, Sahr T, Wälti MA, Boucke K, Buchrieser C & Hilbi H** (2010) The autoinducer synthase LqsA and putative sensor kinase LqsS regulate phagocyte interactions, extracellular filaments and a genomic island of *Legionella pneumophila*. *Environmental Microbiology* **12**: 1243-1259.
- Tiaden A, Spirig T, Carranza P, et al.** (2008) Synergistic contribution of the *Legionella pneumophila* *lqs* genes to pathogen-host interactions. *Journal of Bacteriology* **190**: 7532-7547.
- Tison DL, Pope DH, Cherry WB & Fliermans CB** (1980) Growth of *Legionella pneumophila* in Association with Blue-Green Algae (Cyanobacteria). *Applied and Environmental Microbiology* **39**: 456-459.
- Tossa P, Deloge-Abarkan M, Zmirou-Navier D, Hartemann P & Mathieu L** (2006) Pontiac fever: an operational definition for epidemiological studies. *BMC Public Health* **6**: 112-122.
- Toze S** (1999) PCR and the detection of microbial pathogens in water and wastewater. *Water Research* **33**: 3545-3556.
- Toze S, Cahill M, Sly LI & Fuerst JA** (1994) The effect of *Aeromonas* strains on the growth of *Legionella*. *Journal of Applied Bacteriology* **77**: 169-174.
- Tsuchiya Y, Terao M, Fujimoto T, Nakamura K & Yamamoto M** (2005) Effects of Japan Sea Proper Water on the Growth of *Legionella pneumophila*, *Escherichia coli*, and *Staphylococcus aureus*. *Environmental Health and Preventive Medicine* **10**: 233-238.
- Ullrich S, Karrasch B, Hoppe H, Jeskulke K & Mehrens M** (1996) Toxic Effects on Bacterial Metabolism of the Redox Dye 5-Cyano-2,3-Ditolyl Tetrazolium Chloride. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 4587-4593.
- Van Loosdrecht MCM, Lyklema J, Norde W & Zehnder AJB** (1990) Influence of interfaces on microbial activity. *Microbiological Reviews* **54**: 75-87.
- Venkataraman C, Haack BJ, Bondada S & Abu Kwaik Y** (1997) Identification of a Gal/GalNAc lectin in the protozoan *Hartmannella vermiformis* as a potential receptor for attachment and invasion by the Legionnaires' disease bacterium. *Journal of Experimental Medicine* **186**: 537-547.
- Venkataraman C, Gao LY, Bondada S & Abu Kwaik Y** (1998) Identification of putative cytoskeletal protein homologues in the protozoan host *Hartmannella vermiformis* as substrates for induced tyrosine phosphatase activity upon attachment to the legionnaires' disease bacterium, *Legionella pneumophila*. *Journal of Experimental Medicine* **188**: 505-514.
- Vervaeren H, Temmerman R, Devos L, Boon N & Verstraete W** (2006) Introduction of a boost of *Legionella pneumophila* into a stagnant-watermodel by heat treatment. *FEMS Microbiology Ecology* **58**: 583-592.
- Viboud S** (2003) Dynamique du carbone organique et efficacité de production du bactérioplancton dans la zone pélagique des lacs. Thesis, Université de Genève, Université de Savoie.
- Wadowsky RM, Wolford RS, McNamara AM & Yee RB** (1985) Effect of temperature, pH, and oxygen level on the multiplication of naturally occurring *Legionella pneumophila* in potable water. *Applied and Environmental Microbiology* **49**: 1197-1205.
- Weitere M, Schmidt-Denter K & Arndt H** (2003) Laboratory experiments on the impact of biofilms on the plankton of a large river. *Freshwater Biology* **48**: 1983-1992.
- Wey JK, Norf H, Arndt H & Weitere M** (2009) Role of dispersal in shaping communities of ciliates and heterotrophic flagellates within riverine biofilms. *Limnology and Oceanography* **54**: 1615-1626.

- Wey JK, Scherwass A, Nori H, Arndt H & Weitere M** (2008) Effects of protozoan grazing within river biofilms under semi-natural conditions. *Aquatic Microbial Ecology* **52**: 283-296.
- Whitchurch CB, Tolker-Nielsen T, Ragas PC & Mattick JS** (2002) Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science* **295**: 1487.
- Willks SA & Keevil CW** (2006) Targeting Species-Specific Low-Affinity 16S rRNA Binding Sites by Using Peptide Nucleic Acids for Detection of Legionellae in Biofilms. *Applied and Environmental Microbiology* **72**: 5453-5462.
- Witt V, Wild C & Uthicke S** (2011) Effect of substrate type on bacterial community composition in biofilms from the Great Barrier Reef. *FEMS Microbiology Letters* **323**: 188-195.
- Yanez MA, Carrasco-Serrano C, Barbera VM & Catalan V** (2005) Quantitative Detection of *Legionella pneumophila* in Water Samples by Immunomagnetic Purification and Real-Time PCR Amplification of the dotA Gene. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 3433-3441.
- Yang L, Barken KB, Skindersoe ME, Christensen AB, Givskov M & Tolker-Nielsen T** (2007) Effects of iron on DNA release and biofilm development by *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* **153**: 1318-1328.
- Yaradou DF, Hallier-Soulier S, Moreau S, et al.** (2007) Integrated Real-Time PCR for detection and Monitoring of *Legionella pneumophila* in water systems. *Applied and Environmental Microbiology* **73**: 1452-1456.
- Ylla I, Borrego C, Romani AM & Sabater S** (2009) Availability of glucose and light modulates the structure and function of a microbial biofilm. *FEMS Microbiology Ecology* **69**: 27-42.
- Zhang TC & Bishop PL** (1994) Density, porosity and pore structure of biofilms. *Water Research* **28**: 2267-2277.
- Zhang X & Bishop PL** (2003) Biodegradability of biofilm extracellular polymeric substances. *Chemosphere* **50**: 63-69.
- Zobell CE** (1943) The effect of solid surfaces upon bacterial activity. *Journal of Bacteriology* **46**: 39-56.
- Zwirgmaier K** (2005) Fluorescence *in situ* hybridisation (FISH) - the next generation. *FEMS Microbiology Letters* **246**: 151-158.

12 Annexes

Annexe 1 : Coefficient de corrélation (τ de Kendall) entre les descripteurs des différentes formes de *Lpn* (cultivables, totales, FISH) et les autres descripteurs biologiques des biofilms (bactéries totales, bactéries cultivables, flagellés, ciliés, amibes, poids sec, matière organique). Volet Bassin Versant, sur l'ensemble des données ou par groupe de station (6 Tableaux)

Les calculs ont été effectués sur l'ensemble des données ; par groupes de stations.

Les corrélations significatives ($\alpha=5\%$) sont indiquées en rouge et en gras.

Toutes stations et toutes campagnes confondues	Bact. Cult.	Bact. Totales	Flag. Pigm.	Flag. Non pigm.	Flagellés	Ciliés	Amibes	Protistes	Poids sec	Matière Organique	Bact. Cult. / Bact. Totales	Matière orga / Poids sec	Flag. pigm./ flag.	Flag./ Bact. totales	flag./bact. cult.	Amibes/ Bact. Totales	Bact. Cult./ Amibes
<i>Lpn</i> cult.	0.218	0.169	0.039	0.039	0.030	0.057	0.225	0.042	-0.036	0.043	0.154	0.098	0.048	-0.081	-0.145	0.129	0.065
<i>Lpn</i> totales	0.300	0.301	0.107	0.153	0.159	0.116	0.130	0.154	0.187	0.262	0.224	-0.004	0.095	-0.012	-0.189	-0.018	0.216
<i>Lpn</i> FISH	0.379	0.404	-0.087	-0.051	-0.036	0.162	0.125	0.089	0.188	0.131	0.265	-0.142	-0.081	-0.251	-0.343	-0.093	0.299
<i>Lpn</i> cult./bact. Cult.	0.206	0.159	0.051	0.034	0.029	0.059	0.220	0.044	-0.033	0.047	0.147	0.103	0.060	-0.078	-0.136	0.131	0.063
<i>Lpn</i> totales/Bact. totales	-0.007	-0.238	0.123	0.107	0.115	-0.081	-0.063	-0.060	0.104	0.111	0.112	-0.027	0.107	0.215	0.032	0.110	0.054
<i>Lpn</i> FISH/Bact. Totales	0.152	0.074	-0.188	-0.132	-0.151	-0.092	0.225	-0.117	-0.006	-0.101	0.153	-0.163	-0.171	-0.154	-0.214	0.237	-0.014
<i>Lpn</i> FISH / <i>Lpn</i> totales	0.144	0.208	-0.240	-0.142	-0.164	-0.066	0.285	-0.062	-0.057	-0.112	0.085	-0.098	-0.223	-0.234	-0.201	0.192	-0.042
<i>Lpn</i> cult. / <i>Lpn</i> FISH	0.200	0.127	0.119	0.071	0.068	0.034	0.187	0.052	0.016	0.094	0.162	0.086	0.115	-0.031	-0.110	0.124	0.080
<i>Lpn</i> cult. / <i>Lpn</i> totales	0.215	0.163	0.038	0.040	0.031	0.058	0.221	0.041	-0.038	0.040	0.161	0.093	0.047	-0.077	-0.141	0.128	0.069
<i>Lpn</i> totales/ amibes	0.137	0.048	0.100	0.053	0.077	0.053	-0.404	-0.037	0.077	0.065	0.156	-0.041	0.098	0.061	-0.063	-0.390	0.411
<i>Lpn</i> FISH / amibes	0.195	0.232	-0.117	-0.110	-0.108	0.046	-0.088	-0.071	-0.012	-0.109	0.134	-0.167	-0.107	-0.200	-0.217	-0.153	0.236

Groupe Savières-Plage	Bact. Cult.	Bact. Totales	Flag. Pigm.	Flag. Non pigm.	Flagellés	Ciliés	Amibes	Protistes	Poids sec	Matière Organique	Bact. Cult. / Bact. Totales	Matière orga / Poids sec	Flag. pigm./ flag.	Flag./ Bact. totales	Bact. totales / Amibes	Bact. Cult./ Amibes
<i>Lpn</i> cult.	0.218	-0.137	0.171	-0.138	-0.139	-0.126	0.141	-0.178	-0.242	0.020	0.236	0.333	0.318	-0.098	-0.098	0.137
<i>Lpn</i> totales	0.241	0.285	0.339	0.313	0.348	0.309	0.034	0.375	0.289	0.302	0.080	0.086	0.273	0.179	0.060	-0.020
<i>Lpn</i> FISH	0.294	0.351	0.290	0.140	0.161	0.565	-0.020	0.441	0.119	0.436	0.053	0.325	0.257	0.020	0.126	0.152
<i>Lpn</i> cult./bact. Cult.	0.218	-0.137	0.171	-0.138	-0.139	-0.126	0.141	-0.178	-0.242	0.020	0.236	0.333	0.318	-0.098	-0.098	0.137
<i>Lpn</i> totales/Bact. totales	-0.007	-0.157	0.287	0.224	0.258	0.180	0.000	0.126	-0.015	0.066	0.204	0.131	0.221	0.367	-0.066	-0.144
<i>Lpn</i> FISH/Bact. Totales	0.185	-0.111	0.114	0.099	0.119	0.221	0.074	0.132	-0.146	0.033	0.393	0.242	0.082	0.190	-0.137	0.085
<i>Lpn</i> FISH / <i>Lpn</i> totales	0.020	0.066	-0.107	-0.079	-0.099	0.063	0.067	0.007	-0.132	0.133	0.125	0.184	-0.107	-0.079	-0.079	0.118
<i>Lpn</i> cult. / <i>Lpn</i> FISH	0.218	-0.137	0.171	-0.138	-0.139	-0.126	0.141	-0.178	-0.242	0.020	0.236	0.333	0.318	-0.098	-0.098	0.137
<i>Lpn</i> cult. / <i>Lpn</i> totales	0.218	-0.137	0.171	-0.138	-0.139	-0.126	0.141	-0.178	-0.242	0.020	0.236	0.333	0.318	-0.098	-0.098	0.137
<i>Lpn</i> totales/ amibes	-0.073	0.026	0.287	0.066	0.099	0.348	-0.391	0.152	-0.037	-0.027	-0.217	0.131	0.336	0.066	0.472	0.236
<i>Lpn</i> FISH / amibes	0.086	0.157	0.188	0.132	0.166	0.539	-0.350	0.298	-0.110	0.253	-0.059	0.223	0.156	0.079	0.393	0.341

Groupe Laysse, Hyères, Albanne	Bact. Cult.	Bact. Totales	Flag. Pigm	Flag. Non pigm.	Flagellés	Ciliés	Amibes	Protistes	Poids sec	Matière Organique	Bact. Cult. / Bact. Totales	Matière orga / Poids sec	Flag. pigm./ flag.	Flag./ Bact. totales	Bact. totales / Amibes	Bact. Cult./Amibes
<i>Lpn cult.</i>	0.150	0.262	-0.114	0.015	0.023	0.160	0.137	-0.008	-0.300	-0.220	-0.037	0.157	-0.114	-0.060	0.052	0.022
<i>Lpn totales</i>	0.339	0.324	-0.104	0.164	0.159	0.093	0.141	0.079	-0.021	0.050	0.176	0.113	-0.104	-0.017	-0.009	0.136
<i>Lpn FISH</i>	0.177	0.347	-0.308	-0.120	-0.100	-0.119	0.150	-0.191	0.045	-0.201	0.032	-0.205	-0.297	-0.179	-0.003	-0.078
<i>Lpn cult./bact. Cult.</i>	0.135	0.247	-0.114	0.000	0.008	0.137	0.122	-0.023	-0.316	-0.236	-0.052	0.142	-0.114	-0.075	0.067	0.037
<i>Lpn totales/Bact. totales</i>	-0.080	-0.477	0.185	0.210	0.210	-0.126	-0.078	0.029	0.094	0.146	0.194	0.011	0.195	0.340	-0.228	0.051
<i>Lpn FISH/Bact. Totales</i>	0.000	-0.060	-0.179	-0.239	-0.262	-0.226	0.070	-0.284	-0.018	-0.283	0.051	-0.240	-0.168	-0.134	-0.177	-0.137
<i>Lpn FISH / Lpn totales</i>	0.029	0.228	-0.257	-0.183	-0.170	-0.097	0.076	-0.199	-0.018	-0.241	-0.046	-0.213	-0.246	-0.193	-0.035	-0.109
<i>Lpn cult. / Lpn FISH</i>	0.111	0.130	0.223	0.174	0.182	0.056	0.000	0.069	-0.083	-0.007	0.006	0.142	0.199	0.099	0.043	0.092
<i>Lpn cult. / Lpn totales</i>	0.150	0.262	-0.114	0.015	0.023	0.160	0.137	-0.008	-0.300	-0.220	-0.037	0.157	-0.114	-0.060	0.052	0.022
<i>Lpn totales/ amibes</i>	0.046	0.043	0.158	0.084	0.128	0.009	-0.606	-0.157	-0.124	-0.115	0.109	0.057	0.169	0.158	0.595	0.492
<i>Lpn FISH / amibes</i>	0.037	0.172	0.038	-0.196	-0.149	-0.166	-0.404	-0.429	-0.050	-0.314	0.026	-0.237	0.049	-0.177	0.420	0.289

Groupe Sierroz - Tillet	Bact. Cult.	Bact. Totales	Flag. Pigm	Flag. Non pigm.	Flagellés	Ciliés	Amibes	Protistes	Poids sec	Matière Organique	Bact. Cult. / Bact. Totales	Matière orga / Poids sec	Flag. pigm./ flag.	Flag./ Bact. totales	Bact. totales / Amibes	Bact. Cult./Amibes
<i>Lpn cult.</i>																
<i>Lpn totales</i>	0.100	0.040	0.107	0.169	0.176	0.217	0.244	0.273	-0.007	0.097	0.013	0.226	0.096	0.133	-0.247	-0.146
<i>Lpn FISH</i>	0.332	0.152	-0.272	-0.135	-0.169	-0.063	-0.088	-0.035	0.069	0.022	0.245	-0.099	-0.215	-0.192	0.239	0.272
<i>Lpn cult./bact. Cult.</i>																
<i>Lpn totales/Bact. totales</i>	-0.052	-0.320	0.117	0.253	0.287	-0.027	0.033	0.069	0.109	-0.015	-0.007	-0.020	0.106	0.307	-0.157	-0.137
<i>Lpn FISH/Bact. Totales</i>	0.105	-0.268	-0.233	0.040	0.033	-0.133	-0.220	-0.096	0.122	-0.132	0.098	-0.333	-0.200	0.176	0.013	0.124
<i>Lpn FISH / Lpn totales</i>	0.106	0.046	-0.376	-0.094	-0.154	-0.250	-0.154	-0.180	0.123	-0.059	0.112	-0.257	-0.320	-0.151	0.238	0.296
<i>Lpn cult. / Lpn FISH</i>																
<i>Lpn cult. / Lpn totales</i>																
<i>Lpn totales/ amibes</i>	0.138	-0.380	-0.140	0.100	0.094	-0.205	-0.321	-0.200	0.184	-0.037	0.197	-0.131	-0.154	0.289	0.099	0.275
<i>Lpn FISH / amibes</i>	0.112	-0.118	-0.281	-0.140	-0.094	-0.169	-0.629	-0.221	-0.020	-0.198	0.118	-0.184	-0.319	0.052	0.566	0.380

Groupe Aquarium	Bact. Cult.	Bact. Totales	Flag. Pigm	Flag. Non pigm.	Flagellés	Ciliés	Amibes	Protistes	Poids sec	Matière Organique	Bact. Cult. / Bact. Totales	Matière orga / Poids sec	Flag. pigm./ flag.	Flag./ Bact. totales	Bact. totales / Amibes	Bact. Cult./Amibes
<i>Lpn cult.</i>	0.377	0.435	0.225	0.206	0.206	-0.478	0.328	-0.431	0.353	0.339	0.261	-0.261	0.225	-0.029	-0.261	-0.145
<i>Lpn totales</i>	0.535	0.479	0.218	-0.057	-0.057	-0.298	0.087	-0.269	0.286	0.209	0.254	-0.423	0.218	-0.310	-0.141	0.197
<i>Lpn FISH</i>	0.278	0.278	0.043	-0.141	-0.141	0.196	-0.457	0.118	0.028	-0.059	0.000	-0.222	0.043	-0.278	0.556	0.722
<i>Lpn cult./bact. Cult.</i>	0.236	0.295	0.411	0.120	0.120	-0.312	0.243	-0.281	0.508	0.438	0.236	-0.295	0.411	0.000	-0.295	-0.059
<i>Lpn totales/Bact. totales</i>	0.278	0.056	0.301	-0.366	-0.366	-0.261	-0.171	-0.354	0.197	0.059	0.222	-0.222	0.301	-0.389	0.111	0.389
<i>Lpn FISH/Bact. Totales</i>	-0.222	-0.222	0.043	-0.085	-0.085	0.196	-0.400	0.177	0.085	0.118	-0.056	0.167	0.043	0.000	0.167	0.444
<i>Lpn FISH / Lpn totales</i>	-0.500	-0.389	-0.215	-0.141	-0.141	0.392	-0.343	0.295	-0.197	-0.059	-0.333	0.333	-0.215	0.056	0.222	0.167
<i>Lpn cult. / Lpn FISH</i>	0.319	0.377	0.315	0.147	0.147	-0.410	0.269	-0.369	0.412	0.339	0.319	-0.319	0.315	-0.087	-0.319	-0.087
<i>Lpn cult. / Lpn totales</i>	0.319	0.377	0.315	0.147	0.147	-0.410	0.269	-0.369	0.412	0.339	0.319	-0.319	0.315	-0.087	-0.319	-0.087
<i>Lpn totales/ amibes</i>	0.056	0.056	0.215	-0.479	-0.479	0.261	-0.629	0.118	-0.028	-0.177	0.000	-0.222	0.215	-0.500	0.556	0.833
<i>Lpn FISH / amibes</i>	-0.111	0.111	0.129	-0.310	-0.310	0.458	-0.857	0.354	-0.141	-0.177	-0.167	-0.056	0.129	-0.333	0.722	0.667

Groupe Terre Nue	Bact. Cult.	Bact. Totales	Flag. Pigm	Flag. Non pigm.	Flagellés	Ciliés	Amibes	Protistes	Poids sec	Matière Organique	Bact. Cult. / Bact. Totales	Matière orga / Poids sec	Flag. pigm./ flag.	Flag./ Bact. totales	Bact. totales / Amibes	Bact. Cult./Amibes
<i>Lpn cult.</i>	0.354	0.000	-0.231	0.118	0.118	-0.125	0.118	0.000	0.000	-0.123	0.299	-0.471	-0.231	0.236	-0.236	0.000
<i>Lpn totales</i>	-0.111	0.056	0.182	0.222	0.167	-0.354	-0.333	-0.111	-0.171	-0.029	-0.085	0.278	0.109	0.167	0.389	0.278
<i>Lpn FISH</i>	-0.085	0.366	0.221	-0.366	-0.310	0.478	0.254	0.085	-0.319	-0.353	-0.057	-0.085	0.295	-0.648	0.254	0.028
<i>Lpn cult./bact. Cult.</i>	0.354	0.000	-0.231	0.118	0.118	-0.125	0.118	0.000	0.000	-0.123	0.299	-0.471	-0.231	0.236	-0.236	0.000
<i>Lpn totales/Bact. totales</i>	-0.111	-0.611	-0.327	-0.111	-0.167	-0.354	-0.444	-0.444	0.114	0.203	-0.085	0.167	-0.400	0.056	0.167	0.056
<i>Lpn FISH/Bact. Totales</i>	-0.056	-0.222	-0.255	-0.278	-0.333	0.118	-0.389	-0.278	0.000	0.029	0.085	-0.111	-0.182	-0.222	0.333	0.333
<i>Lpn FISH / Lpn totales</i>	0.085	0.479	0.184	-0.141	-0.085	0.359	0.592	0.197	-0.377	-0.588	0.000	-0.254	0.258	-0.423	-0.085	-0.197
<i>Lpn cult. / Lpn FISH</i>	0.354	0.000	-0.231	0.118	0.118	-0.125	0.118	0.000	0.000	-0.123	0.299	-0.471	-0.231	0.236	-0.236	0.000
<i>Lpn cult. / Lpn totales</i>	0.354	0.000	-0.231	0.118	0.118	-0.125	0.118	0.000	0.000	-0.123	0.299	-0.471	-0.231	0.236	-0.236	0.000
<i>Lpn totales/ amibes</i>	0.111	-0.278	-0.036	-0.111	-0.056	-0.118	-0.667	-0.222	0.171	0.319	0.141	0.056	-0.109	-0.056	0.611	0.500
<i>Lpn FISH / amibes</i>	-0.056	0.000	-0.109	-0.278	-0.222	0.236	-0.278	-0.167	-0.114	-0.029	-0.028	-0.111	-0.036	-0.333	0.556	0.222

Annexe 2 : Coefficient de corrélation (τ de Kendall) entre les descripteurs des différentes formes de Lpn (cultivables, totales, FISH) et les descripteurs environnementaux (lumière, vitesse, débits, COD, concentrations ioniques, conductivité, pH, température).

Les calculs ont été effectués sur l'ensemble des données ; par groupes de stations.

Les corrélations significatives ($\alpha=5\%$) sont indiquées en rouge et en gras.

Toutes stations et toutes campagnes confondues	Groupe lumière	Vitesse	Débit tot.	Débit pré-incub.	Débit incub.	COD	chlorures	sulfates	nitrites	phosphates	potassium	calcium	sodium	magnesium	Conductivité	pH	Temp
Lpn cult.	-0.373	0.254	-0.261	-0.229	-0.268	-0.145	0.178	0.260	0.141	0.218	0.155	0.238	0.252	0.247	0.145	-0.092	0.111
Lpn totales	-0.091	0.183	-0.176	-0.117	-0.206	-0.114	0.133	0.130	0.198	0.033	0.050	0.204	0.156	0.195	0.192	-0.033	0.307
Lpn FISH	-0.117	0.284	-0.294	-0.291	-0.283	-0.138	0.236	0.188	0.271	0.102	0.018	0.251	0.173	0.173	0.319	-0.008	0.032
Lpn cult./bact. Cult.	-0.371	0.252	-0.261	-0.229	-0.270	-0.133	0.187	0.263	0.142	0.220	0.161	0.239	0.258	0.251	0.145	-0.093	0.110
Lpn totales/Bact. totales	0.031	-0.020	0.046	0.031	0.046	-0.091	-0.088	-0.051	-0.004	-0.042	0.019	-0.013	-0.023	-0.003	-0.071	0.069	0.211
Lpn FISH/Bact. Totales	-0.023	0.098	-0.128	-0.074	-0.176	-0.126	0.103	0.076	0.130	-0.065	0.015	0.085	0.054	0.128	0.038	-0.359	0.184
Lpn FISH / Lpn totales	-0.015	0.113	-0.188	-0.130	-0.245	-0.067	0.142	0.100	0.126	-0.052	0.003	0.094	0.075	0.121	0.080	-0.432	0.080
Lpn cult. / Lpn FISH	-0.360	0.238	-0.276	-0.225	-0.277	-0.114	0.154	0.263	0.117	0.218	0.121	0.214	0.207	0.245	0.112	-0.030	0.076
Lpn cult. / Lpn totales	-0.369	0.250	-0.260	-0.228	-0.266	-0.136	0.185	0.256	0.148	0.216	0.160	0.236	0.256	0.248	0.150	-0.099	0.109
Lpn totales/ amibes	0.054	0.007	0.010	-0.002	0.021	0.030	0.151	0.032	0.191	0.020	0.119	0.071	0.163	0.063	0.219	0.057	0.008
Lpn FISH / amibes	0.053	0.100	-0.125	-0.095	-0.149	-0.058	0.206	0.062	0.212	-0.027	0.068	0.061	0.128	0.145	0.178	-0.259	0.052

Groupe Savières - Plage	Débit tot.	Débit pré-incub.	Débit incub.	COD	chlorures	sulfates	nitrites	phosphates	potassium	calcium	sodium	magnesium	Conductivité	pH	Temp
Lpn cult.				-0.261	-0.059	0.020	0.179	0.024	0.323	0.098	0.305	0.342	0.357	0.357	-0.118
Lpn totales	-0.056	-0.056	-0.056	0.174	0.233	0.289	-0.544	-0.305	-0.205	0.053	0.110	0.048	-0.376	0.137	0.570
Lpn FISH	0.029	0.029	0.029	0.202	0.260	0.221	-0.087	0.000	0.082	-0.292	0.165	0.143	0.222	0.034	0.043
Lpn cult./bact. Cult.				-0.261	-0.059	0.020	0.179	0.024	0.323	0.098	0.305	0.342	0.357	0.357	-0.118
Lpn totales/Bact. totales	-0.056	-0.056	-0.056	0.153	0.238	0.173	-0.412	-0.460	-0.155	-0.138	0.034	0.189	-0.414	0.042	0.235
Lpn FISH/Bact. Totales	0.111	0.111	0.000	0.200	0.033	-0.046	-0.020	-0.117	0.175	-0.315	0.027	0.302	0.118	-0.050	-0.042
Lpn FISH / Lpn totales	0.056	-0.056	0.167	0.057	0.026	0.013	0.425	0.293	0.291	-0.204	0.014	0.135	0.481	-0.025	-0.454
Lpn cult. / Lpn FISH				-0.261	-0.059	0.020	0.179	0.024	0.323	0.098	0.305	0.342	0.357	0.357	-0.118
Lpn cult. / Lpn totales				-0.261	-0.059	0.020	0.179	0.024	0.323	0.098	0.305	0.342	0.357	0.357	-0.118
Lpn totales/ amibes	-0.333	-0.222	0.000	-0.105	-0.066	0.000	-0.412	-0.276	-0.345	-0.270	0.211	0.067	-0.278	0.312	0.336
Lpn FISH / amibes	-0.028	-0.028	0.197	-0.048	-0.053	-0.040	-0.080	0.075	-0.061	-0.480	0.197	0.081	0.194	0.160	-0.034

Groupe Laysse, Hyères, Albanne	Débit tot.	Débit pré-incub.	Débit incub.	COD	chlorures	sulfates	nitrates	phosphates	potassium	calcium	sodium	magnesium	Conductivite	pH	Temp
<i>Lpn cult.</i>	0.093	0.189	0.059	0.048	-0.082	-0.174	-0.068	-0.045	0.114	0.232	-0.075	-0.060	-0.081	0.064	-0.027
<i>Lpn totales</i>	0.041	0.283	-0.088	0.016	-0.072	0.026	0.035	-0.305	-0.071	-0.026	-0.047	0.073	-0.158	-0.123	0.125
<i>Lpn FISH</i>	0.068	0.128	0.101	0.268	-0.009	-0.114	-0.070	-0.187	-0.174	0.147	-0.041	-0.009	0.136	0.015	-0.030
<i>Lpn cult./bact. Cult.</i>	0.076	0.171	0.042	0.067	-0.067	-0.159	-0.053	-0.027	0.129	0.247	-0.060	-0.045	-0.063	0.045	-0.045
<i>Lpn totales/Bact. totales</i>	0.003	-0.054	0.050	-0.111	-0.228	0.046	0.118	0.236	0.148	-0.120	-0.032	0.046	-0.156	0.169	0.073
<i>Lpn FISH/Bact. Totales</i>	0.114	0.007	0.234	0.206	-0.108	-0.115	-0.049	0.149	-0.119	0.177	-0.106	-0.034	0.004	0.191	0.095
<i>Lpn FISH / Lpn totales</i>	0.118	0.081	0.159	0.268	0.081	-0.157	-0.096	-0.106	-0.155	0.167	0.003	-0.069	0.158	0.045	-0.044
<i>Lpn cult. / Lpn FISH</i>	-0.104	0.189	-0.097	0.214	-0.031	-0.019	-0.143	0.074	0.069	0.105	-0.143	0.037	-0.193	0.240	-0.119
<i>Lpn cult. / Lpn totales</i>	0.093	0.189	0.059	0.048	-0.082	-0.174	-0.068	-0.045	0.114	0.232	-0.075	-0.060	-0.081	0.064	-0.027
<i>Lpn totales/ amibes</i>	0.356	0.361	0.289	0.044	0.160	-0.087	0.262	0.007	0.169	-0.137	0.210	0.040	0.291	0.070	-0.186
<i>Lpn FISH / amibes</i>	0.312	0.288	0.338	0.198	0.254	-0.078	0.178	0.000	-0.047	0.009	0.224	0.066	0.305	0.099	-0.150

Groupe Sierroz - Tillet	Débit tot.	Débit pré-incub.	Débit incub.	COD	chlorures	sulfates	nitrates	phosphates	potassium	calcium	sodium	magnesium	Conductivite	pH	Temp
<i>Lpn cult.</i>															
<i>Lpn totales</i>	-0.146	-0.047	-0.266	-0.313	0.040	0.000	-0.054	0.077	0.242	0.033	0.020	0.053	-0.213	-0.253	0.625
<i>Lpn FISH</i>	-0.099	-0.080	-0.219	-0.268	-0.047	0.046	-0.007	-0.085	-0.181	-0.153	-0.133	-0.099	-0.288	-0.052	0.029
<i>Lpn cult./bact. Cult.</i>															
<i>Lpn totales/Bact. totales</i>	0.033	0.052	-0.059	-0.209	-0.033	-0.124	0.020	0.133	0.351	0.039	0.026	-0.020	-0.350	-0.256	0.486
<i>Lpn FISH/Bact. Totales</i>	0.085	0.105	-0.033	-0.363	0.046	-0.150	0.151	0.033	0.073	-0.197	-0.026	-0.072	-0.283	-0.222	0.086
<i>Lpn FISH / Lpn totales</i>	0.020	-0.013	0.007	-0.033	0.007	0.072	-0.007	-0.067	-0.233	-0.119	-0.079	-0.112	-0.034	0.181	-0.375
<i>Lpn cult. / Lpn FISH</i>															
<i>Lpn cult. / Lpn totales</i>															
<i>Lpn totales/ amibes</i>	-0.039	-0.046	0.000	0.133	-0.079	0.026	0.198	-0.059	0.146	0.072	-0.020	-0.157	-0.159	-0.197	0.077
<i>Lpn FISH / amibes</i>	0.039	0.007	0.105	-0.011	-0.139	-0.026	0.172	0.025	-0.179	-0.217	-0.217	-0.367	-0.209	0.146	-0.211

Groupe Aquarium	Débit tot.	Débit pré-incub.	Débit incub.	COD	chlorures	sulfates	nitrates	phosphates	potassium	calcium	sodium	magnesium	Conductivite	pH	Temp
<i>Lpn</i> cult.	0.029	0.145	0.145	-0.340	-0.059	0.319	-0.377	-0.189	-0.087	0.435	0.000	0.319	-0.491	-0.154	0.794
<i>Lpn</i> totales	-0.085	0.028	0.028	-0.400	-0.171	0.085	-0.141	0.036	-0.141	0.535	-0.343	0.197	-0.400	-0.074	0.764
<i>Lpn</i> FISH	-0.056	-0.278	0.278	-0.214	-0.028	0.000	-0.167	0.357	0.222	0.111	-0.310	-0.167	-0.143	0.764	-0.071
<i>Lpn</i> cult./bact. Cult.	0.177	0.295	0.236	-0.231	0.090	0.354	-0.295	-0.154	0.000	0.530	0.030	0.354	-0.540	-0.196	0.926
<i>Lpn</i> totales/Bact. totales	0.167	0.056	0.389	-0.143	-0.141	0.111	-0.167	0.000	0.333	0.444	-0.310	0.056	-0.786	0.327	0.429
<i>Lpn</i> FISH/Bact. Totales	0.333	0.111	0.444	0.143	0.197	-0.056	-0.222	0.143	0.500	-0.056	-0.141	-0.333	-0.357	0.764	0.000
<i>Lpn</i> FISH / <i>Lpn</i> totales	0.278	0.056	0.167	0.571	0.141	-0.222	0.056	0.143	0.333	-0.333	-0.028	-0.389	0.071	0.473	-0.286
<i>Lpn</i> cult. / <i>Lpn</i> FISH	0.087	0.203	0.203	-0.265	0.000	0.261	-0.319	-0.113	-0.029	0.493	-0.059	0.261	-0.567	-0.154	0.869
<i>Lpn</i> cult. / <i>Lpn</i> totales	0.087	0.203	0.203	-0.265	0.000	0.261	-0.319	-0.113	-0.029	0.493	-0.059	0.261	-0.567	-0.154	0.869
<i>Lpn</i> totales/ amibes	0.167	-0.056	0.500	-0.143	-0.028	-0.222	0.056	0.286	0.333	0.444	-0.535	-0.278	-0.357	0.473	0.143
<i>Lpn</i> FISH / amibes	0.111	-0.111	0.444	-0.071	0.028	-0.167	0.000	0.500	0.389	0.278	-0.423	-0.333	-0.143	0.546	-0.071

Groupe Terre Nue	Débit tot.	Débit pré-incub.	Débit incub.	COD	chlorures	sulfates	nitrates	phosphates	potassium	calcium	sodium	magnesium	Conductivite	pH	Temp
<i>Lpn</i> cult.				0.357	0.471	0.000	0.471	0.357	0.354	-0.359	0.478	0.471	0.500	-0.500	-0.214
<i>Lpn</i> totales				-0.071	-0.667	-0.500	-0.056	0.071	0.111	0.028	-0.085	-0.333	-0.214	0.143	0.214
<i>Lpn</i> FISH				-0.714	0.028	0.310	-0.028	-0.429	-0.704	0.114	-0.171	-0.310	-0.143	0.071	0.143
<i>Lpn</i> cult./bact. Cult.				0.357	0.471	0.000	0.471	0.357	0.354	-0.359	0.478	0.471	0.500	-0.500	-0.214
<i>Lpn</i> totales/Bact. totales				0.143	-0.333	-0.167	-0.056	0.143	0.111	0.366	-0.366	0.000	-0.286	0.214	-0.143
<i>Lpn</i> FISH/Bact. Totales				-0.429	-0.056	0.222	0.333	-0.286	-0.500	0.197	-0.366	-0.500	-0.286	0.071	0.000
<i>Lpn</i> FISH / <i>Lpn</i> totales				-0.255	0.197	0.310	0.141	-0.109	-0.479	-0.114	0.114	0.085	0.036	-0.109	0.255
<i>Lpn</i> cult. / <i>Lpn</i> FISH				0.357	0.471	0.000	0.471	0.357	0.354	-0.359	0.478	0.471	0.500	-0.500	-0.214
<i>Lpn</i> cult. / <i>Lpn</i> totales				0.357	0.471	0.000	0.471	0.357	0.354	-0.359	0.478	0.471	0.500	-0.500	-0.214
<i>Lpn</i> totales/ amibes				-0.286	-0.444	-0.278	0.056	-0.143	0.000	0.254	-0.310	-0.444	-0.286	0.214	-0.143
<i>Lpn</i> FISH / amibes				-0.571	-0.167	0.111	0.111	-0.286	-0.500	0.423	-0.254	-0.389	-0.143	0.071	-0.143

Annexe 3: Comparaison des descripteurs du biofilms entre la station Mirabeau et les stations aval pour chaque campagne du volet II (p-values ; test de Mann Whitney)

La différence est significative pour $p < 0.05$ (valeur en rouge et en gras)

Codes des stations : Mi : Mirabeau ; Pa : Parking ; Li : Liège ; Le : Lepic ; Aq : Aquarium

campagne	stations	Bactéries cultivables	Lpn cultivables	P. aeruginosa cultivables	Bactéries totales	Lpn totales	Lpn FISH	P. aeruginosa FISH	Flagellés pigmentés	Flagellés non pigmentés	flagellés totaux	Amibes	Ciliés	Poids sec biofilm	Matière organique biofilm
décembre-07	Mi/Pa	0.127	0.190	0.050	0.050	0.050	0.050	0.050	0.513	0.827	0.827	0.383	0.190	0.050	0.827
	Mi/Li	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Mi/Le	0.050	0.190	0.050	0.050	0.050	0.050	0.190	1.000	0.190	0.190	0.513	0.050	0.050	0.050
	Mi/Aq	0.050	0.190	0.050	0.050	0.050	0.050	0.050	1.000	0.127	0.127	0.127	0.190	0.050	0.127
juin-08	Mi/Pa	0.050	1.000	0.827	0.275	0.663	0.050	0.050	0.050	0.050	0.050	1.000	0.513	0.050	0.127
	Mi/Li	1.000	0.190	0.050	0.275	0.050	0.050	0.050	0.081	0.081	0.081	1.000	0.827	0.513	0.275
	Mi/Le	0.190	1.000	0.513	0.127	0.663	0.050	0.050	0.050	0.050	0.050	0.275	0.513	0.050	0.513
	Mi/Aq	0.050	0.513	0.050	0.050	0.275	0.050	0.050	0.050	0.050	0.050	0.513	1.000	0.050	0.050
septembre-08	Mi/Pa	0.050	1.000	0.050	0.050	0.663	0.383	0.050	0.127	0.127	0.127	0.050	1.000	0.050	0.050
	Mi/Li	0.081	0.050	0.050	0.050	0.050	0.513	0.127	0.383	0.383	0.383	0.383	1.000	0.050	0.050
	Mi/Le	0.050	0.513	0.050	0.050	0.275	0.663	0.050	0.513	0.513	0.513	0.050	1.000	0.513	0.050
	Mi/Aq	0.050	0.050	0.050	0.050	1.000	0.190	0.275	0.513	0.513	0.513	0.513	1.000	0.827	0.050
décembre-08	Mi/Pa	0.827	1.000	0.275	0.827	0.827	0.827	0.127	0.050	0.050	0.050	0.513	1.000	0.827	0.050
	Mi/Li	0.827	0.050	0.513	0.050	0.663	0.827	0.275	0.050	0.050	0.050	0.513	1.000	0.050	0.050
	Mi/Le	0.050	1.000	0.050	0.050	1.000	0.513	0.827	0.050	0.050	0.050	0.513	1.000	0.050	1.000
	Mi/Aq	0.081	0.050	0.127	0.127	0.513	0.513	0.050	0.275	0.275	0.275	0.513	1.000	0.050	0.050
mars-09	Mi/Pa	0.050	1.000	0.050	0.127	0.513	0.050	0.275	0.663	0.663	0.663	0.050	0.513	0.513	0.127
	Mi/Li	0.513	0.050	0.050	0.050	0.050	0.827	0.050	0.050	0.050	0.050	0.275	1.000	0.050	0.050
	Mi/Le	0.050	0.513	0.050	0.513	0.127	0.275	0.827	0.827	0.827	0.827	0.050	0.513	0.050	0.050
	Mi/Aq	0.050	0.050	0.050	0.050	0.050	0.050	0.050	0.383	0.081	0.081	0.383	0.513	0.050	0.050
juin-09	Mi/Pa	0.513	1.000	0.275	0.827	0.050	0.050	0.513	0.050	0.050	0.050	0.513	0.513	0.513	0.275
	Mi/Li	0.050	0.050	0.050	0.383	0.050	0.050	0.827	0.383	0.383	0.383	0.513	0.513	0.050	0.127
	Mi/Le	0.050	0.190	0.050	0.050	0.050	0.050	0.513	0.827	0.827	0.827	0.275	0.513	0.050	0.050
	Mi/Aq	0.050	0.050	0.050	0.050	0.050	0.050	0.513	0.050	0.050	0.050	0.050	0.513	0.050	0.827

Annexe 4: Comparaison des rapports entre descripteurs du biofilms entre la station Mirabeau et les stations aval pour chaque campagne du volet II (p-values ; test de Mann Whitney)
La différence est significative pour p<0.05 (valeur en rouge et en gras)
Codes des stations : Mi : Mirabeau ; Pa : Parking ; Li : Liège ; Le : Lepic ; Aq : Aquarium

campagne	stations	Poids sec / Matière organique	Bactéries cultivables / Bactéries totales	Lpn totales / Bactéries totales	P.aeruginosa FISH / Bactéries totales	P.aeruginosa cultivables / Bactéries cultivables
décembre-07	Mi/Pa	0.050	0.127	0.050	0.050	0.513
	Mi/Li	-	-	-	-	-
	Mi/Le	0.050	0.050	0.050	0.050	0.050
	Mi/Aq	0.050	0.050	0.050	0.050	0.127
juin-08	Mi/Pa	0.050	0.127	0.827	0.050	0.050
	Mi/Li	0.513	0.827	0.050	0.050	0.050
	Mi/Le	0.050	0.275	0.827	0.050	0.050
	Mi/Aq	0.050	0.275	0.275	0.050	0.050
septembre-08	Mi/Pa	0.275	0.275	0.275	0.275	0.050
	Mi/Li	0.275	0.513	0.050	0.275	0.050
	Mi/Le	0.050	0.050	0.275	0.383	0.050
	Mi/Aq	0.050	0.050	0.127	0.275	0.050
décembre-08	Mi/Pa	0.050	0.275	0.827	0.275	0.275
	Mi/Li	0.050	0.513	0.275	0.513	0.275
	Mi/Le	0.050	0.050	0.275	0.127	0.050
	Mi/Aq	0.050	0.275	0.513	0.050	0.513
mars-09	Mi/Pa	0.050	0.050	0.827	0.127	0.827
	Mi/Li	0.050	0.127	0.050	0.513	0.050
	Mi/Le	0.050	0.050	0.050	0.827	0.050
	Mi/Aq	0.050	0.050	0.050	0.050	0.827
juin-09	Mi/Pa	0.827	0.827	0.275	0.513	0.513
	Mi/Li	0.050	0.827	0.050	0.513	0.050
	Mi/Le	0.050	0.050	0.050	0.513	0.050
	Mi/Aq	0.050	0.827	0.275	0.827	0.050

Annexe 5: Coefficient de corrélation (τ de Kendall) entre les descripteurs des différentes formes de Lpn (cultivables, totales) et les descripteurs des différentes formes de *P. aeruginosa*
A : par station / B : par campagne
Les corrélations significatives ($\alpha=5\%$) sont indiquées en rouge et en gras.

A - Par station

	Mirabeau	Parking	Liège	Lepic	Aquarium
Lpn cultivables - <i>P. aer.</i> Cultivables	-	0.115	0.738	0.430	0.000
Lpn totales - <i>P. aer.</i> FISH	0.200	0.067	-0.800	-0.200	-0.067
%Lpn cult. - % <i>P. aer.</i> Cult	-	0.346	1.000	0.430	0.138

B - Par campagne

	décembre-07	juin-08	septembre-08	décembre-08	mars-09	juin-09
Lpn cultivables - <i>P. aer.</i> Cultivables	0.913	-0.632	0.359	0.120	-0.120	0.949
Lpn totales - <i>P. aer.</i> FISH	-0.667	-0.949	0.671	-0.949	0.400	0.000
%Lpn cult. - % <i>P. aer.</i> Cult	0.183	-0.632	0.598	0.258	-0.378	0.949

RESUME :

L'étude s'intéresse à la bactérie *Legionella pneumophila* (*Lpn*) dans les biofilms des affluents du lac du Bourget. Elle confirme le caractère ubiquiste de cette bactérie, principalement sous sa forme non cultivable. Elle met aussi en évidence, le caractère local des facteurs naturels de régulation : seule la température de l'eau intervient dans la majorité des sites.

Ce déterminisme local a aussi été mis en évidence avec l'étude du réseau hydrographique aixois qui reçoit à la fois des eaux thermales et celles de la rivière Le Tillet. Les perturbations thermique et chimique liées aux arrivées d'eau chaude sont détectables jusqu'à la partie aval du réseau. L'effet d'enrichissement des apports en *Lpn* qui leur correspondent reste localisé ce qui peut être la manifestation de processus naturels d'autoépuration. Nos résultats montrent également un comportement différent des organismes du groupe des *Pseudomonas* et des bactéries apparentées vis-à-vis des caractéristiques physico-chimiques.

Des expériences effectuées en réacteurs biologiques ont montré qu'une augmentation de la vitesse ou de la température de l'eau est favorable à la présence de *Lpn*.

Un modèle de transport de charges a été construit à partir duquel une gestion de l'utilisation du jet d'eau situé à proximité de la plage municipale d'Aix-les-Bains pourrait être faite pour tenir compte des périodes durant lesquelles des fragments de biofilms susceptibles de contenir des *Lpn* sont transportés en masse par le réseau aixois en direction de la plage.

Mots-clés : *Legionella pneumophila*, biofilms, facteurs de régulation, relations interspécifiques.

ABSTRACT :

The study concerns the occurrence of the bacteria *Legionella pneumophila* (*Lpn*) in biofilms from Lake Bourget tributaries. It confirms the ubiquity of the bacteria in flowing waters, but mainly as viable but non culturable state. It highlights that main environmental control factors are local, at the exception of water temperature which is involved in most studied sites.

Local control of biofilms development has also been demonstrated in the study of the Aix-les-Bains hydrological network which receives hot springs water and water from the Tillet river. Thermal and chemical disturbances induced by hot waters entrances could still be detected at the farthest downstream part of the network. Biofilms enrichment in *Lpn* related to these incomings kept localized possibly due to self-purification processes. Our results depict different answers of microorganisms like *Pseudomonas* and related bacteria towards physicochemical characteristics.

Two experiments were performed based on biological reactors, showing that increases of water temperature or water flow, both enhance *Lpn* concentration.

An hydrological transport model has been designed to serve the management of a waterspout sited by the Aix-les-Bains beach. It is written especially to address periods where biofilms transport holding high *Lpn* concentrations should be avoided.

Keywords: *Legionella pneumophila*, biofilms, environmental control factors, interspecific interactions.